



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



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OVER KANSERİNDE MİRNA ANALİZİ İLE MOLEKÜLER  
TANI VE İZLEME**

**Ece GÜMÜŞOĞLU**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü**

**Danışman**

**Doç.Dr.Tuba GÜNEL**

**Haziran, 2016**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 02/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:**

  
İmza  
Doç. Dr. Tuba GÜNEL  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
İmza  
Prof. Dr. E.Ş. Nazlı ARDA  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
İmza  
Prof. Dr. Ayşegül TOPAL  
SARIKAYA  
Yeni Yüzyıl Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

İmza  
Prof. Dr. Ali BENİAN  
İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



İmza  
Doç. Dr. Samet TOPUZ  
İstanbul Üniversitesi  
Tıp Fakültesi





Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 47803 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Akademik hayatımın önemli aşamasından birini tamamlamak üzereyim. Çok zorlu ve meşakkatli örnek toplama ve deney adımlarının ardından çalışmanın sonuna gelmiş olmanın sevincini ve gururunu yaşamaktayım. Yürütmüş olduğum yüksek lisans tezimin hem akademik hem deneysel olarak bana fazlaca deneyim kazandırdığını açıkça hissetmekteyim.

Sadece tezin yürütülmesinde değil, akademik ve sosyal hayatımda her zaman destekçim, yol göstericim olarak gördüğüm ve hissettiğim, engin tecrübe ve bilgisiyle her zaman yanımda olan danışmanım, sayın Doç.Dr.Tuba GÜNEL'e;

Uzun soluklu örnek toplama aşamasında bana yardımcı olan sayın Doç.Dr.Samet TOPUZ'a ve Dr.Taylan ŞENOL'a; projenin oluşmasında ve ilerlemesinde tıbbi olarak destek aldığım sayın Prof.Dr.Kılıç AYDINLI'ya;

İhtiyacım olan her anda yardımına seve seve koşan, sevgi, bilgi ve enerji dolu bölüm başkanımız sayın Prof.Dr.E.Ş.Nazlı ARDA'ya ve bölümümüzün saygıdeğer öğretim üyelerine; görünmez destekçiler olarak bölüm asistanlarına;

Laboratuvar ortamında; olmasaydı ne yapardım dediğim, gerektiğinde pipeti elimden alarak nasıl yapılması gerektiğini gösteren, her zaman en sakin şekilde olayları karşılayan ve bana yol gösteren ağabeyim olarak gördüğüm Dr.Mohammad Kazem HOSSEINI'ye;

Deneysel olarak bana yardımcı olan labın neşeleri yüksek lisans öğrencileri Tuğçe ŞENTÜRK, Berkcan DOĞAN, İsmail DÖLEKÇAP ve lisans öğrencisi İrem Gülfem ALBAYRAK'a teşekkürleri kendime borç bilirim.

Son olarak tüm hayatım boyunca yaptığım her yanlışta, doğrudan, başarıda veya başarısızlıkta bana olan sonsuz inançlarıyla beni sonuna kadar destekleyen, dinleyen ve anlamadığı deneyler hakkında bile beni rahatlatarak yorumlar yapabilen en büyük destekçim özellikle anneme ve tabiki babama minnetle sonsuz, sayısız teşekkür ederim.

Haziran, 2016

Ece GÜMÜŞOĞLU

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ .....	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	ix
ÖZET.....	xiii
SUMMARY .....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. OVER KANSERİ .....	2
1.2. OVER KANSERİ TANISI .....	3
1.3. MALZEME VE YÖNTEM .....	4
1.4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	5
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>6</b>
2.1. OVER KANSERİ VE GELİŞİMİ .....	6
2.1.1. Over Kanseri Biyolojisi.....	6
2.2. OVER KANSERİ İNSİDANSI VE ETİYOLOJİSİ .....	12
2.2.1. Over Kanseri İnsidansı .....	12
2.2.2. Over Kanseri Etiyolojisi.....	13
2.3. OVER KANSERİNDE SINIFLANDIRMA.....	14
2.4. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	16
2.4.1. Pelvik Muayenesi .....	16
2.4.2. Tanısal Görüntüleme .....	16
2.4.3. Diğer Testler.....	17
2.4.3.1. Laparoskopi.....	17
2.4.3.2. Kolonoskopi.....	17
2.4.3.3. Biyopsi .....	18
2.4.3.4. Kan testleri .....	18
2.5. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER....	19

2.5.1. Protein Temelli Over Kanseri Belirteçleri .....	20
2.5.2. Gen Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri .....	23
2.5.2.1. Kalıtsal Gen Mutasyonları .....	24
2.5.2.2. Epigenetik Değişimler .....	25
2.5.2.3. Gen Anlatımı.....	26
2.5.3. Metabolit Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri .....	26
2.5.4. MikroRNA Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri .....	27
2.5.4.1. miRNA Biyogenezi .....	28
2.5.4.2. Over Kanseri Tanısında miRNA'ların Rolü .....	30
2.5.5. Over Kanseri Biyobelirteç Panelleri .....	32
2.6. DOLAŞIMDA BULUNAN TÜMÖR MATERYALLERİ .....	33
2.6.1. Serbest Tümör Hücreleri (CTC).....	34
2.6.2. Serbest Dolaşan ve Tümör Hücre DNA'sı.....	35
2.6.3. Serbest Dolaşan RNA (cfRNA) .....	36
2.6.4. Serbest Dolaşan miRNA .....	36
2.6.5. Eksozomlar ve Dolaşan Mikrovesiküller .....	37
2.7. OVER KANSERİ TANISINDA MİRNA ANLATIM ANALİZİ TEKNOLOJİLERİ.....	37
2.7.1. Revers-Transkripsiyon Kantitatif PCR (RT-qPCR).....	38
2.7.2. "In-situ" hibridizasyon (ISH).....	39
2.7.3. Mikroarray.....	39
2.7.4. Yeni Nesil Dizileme ("Next Generation Sequencing-NGS") .....	40
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>41</b>
3.1. ÖRNEK TOPLAMA .....	41
3.2. TOTAL RNA İZOLASYONU .....	42
3.2.1. Serumdan total RNA izolasyonu:.....	42
3.2.2. Tümör ve kist dokularından total RNA izolasyonu .....	43
3.3. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN BİYOANALİZÖRDE KONTROLÜ .....	44
3.4. MİKROARRAY UYGULAMASI .....	48
3.4.1. İzole Edilen RNA'ların Mikroarraye Hazırlanması .....	49
3.4.2. İşaretleme .....	49
3.4.2.1. "Spike-in" Solusyonunun Hazırlanması .....	49
3.4.2.2. İşaretleme (Labelling) .....	50
3.4.3. Denatürasyon.....	50
3.4.4. Ligasyon ve örneklerin kurutulması.....	50

3.4.5. 10X “blocking agent” hazırlama .....	51
3.4.6. Hibridizasyon ve Slaytlara Örnek Yükleme .....	51
3.4.7. Yıkama ve Çip Tarama .....	52
3.5. SONUÇ DEĞERLENDİRME VE ANALİZ .....	54
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>56</b>
4.1. ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ .....	56
4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER .....	57
4.2.1. Örneklerin Kalite Kontrolü .....	57
4.2.2. MikroRNA Mikroarray Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....	59
4.2.2.1. Dokudan Elde Edilen miRNA'ların Analizi .....	60
4.2.2.2. Serumdan Elde Edilen miRNA'ların Analizi .....	67
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>82</b>
5.1. DOKU ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN MİRNA'LAR .....	83
5.2. SERUM ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN MİRNA'LAR .....	86
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>90</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>105</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1: Normal over ile over kanserinin fiziksel olarak karşılaştırılması.....	7
Şekil 2.2: Yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu), Türkiye (Köse ve diğ, 2014). ....	12
Şekil 2.3: Over kanserinin yaşa göre görülme sıklığı, yıllık vaka sayısı ve oranları.....	13
Şekil 2.4: Over kanserinin sınıflandırılması. ....	15
Şekil 2.5: Over kanserinin evreleri. ....	16
Şekil 2.6: miRNA biyogenezi (Winter ve diğ, 2009). ....	30
Şekil 3.1: Biyoanalizör uygulama aşamaları. ....	45
Şekil 3.2: “RNA Nano Chip” görüntüsü. ....	46
Şekil 3.3: Hava basıncı enjektörü ve çip yükleme aparatı.....	46
Şekil 3.4: “Ladder” kuyucuğun elektroferogram görüntüsü.....	47
Şekil 3.5: RNA 6000 Nano analiz sonucunda elde edilen yıkılmamış ve degrede olmuş RNA görüntüleri. ....	48
Şekil 3.6: Agilent mikroarray tarayıcı. ....	49
Şekil 3.7: A) 8 bölgele lastikli lam. B) Lastikli lama örnek yükleme pozisyonu C) İnsan miRNA prob lam yerleştirme pozisyonu D) Lam tutucusun hazır hale getirme. ....	52
Şekil 3.8: Yıkama kabında slayt tutucu yardımıyla yapılan yıkama. ....	53
Şekil 3.9: A) Taramaya hazır lamı lam tutucuda yerleştirme B) Lam tutucusunu mikroarray tarayıcıya yerleştirme.....	54
Şekil 3.10: Tarama sonrası elde edilen “.tiff” uzantılı slayt görüntüsü. ....	54
Şekil 4.1: Doku örneklerinin biyoanalizör ile değerlendirilmesi. Hasta 1: Yıkılmış RNA örneği (RIN:2.30), Hasta 2: Kaliteli RNA örneği (RIN:7); Hasta 3: Değerlendirilemeyen RNA örneği (RIN N/A).....	59
Şekil 4.2: “Agilent Feature Extraction v12.0” programından elde edilen QC raporu. Hibridizasyonun, işaretlemenin, örneklerin ve yıkama aşamalarının QC analizi.....	60
Şekil 4.3: Over kanseri, nüks etmiş ve basit over kisti doku ve serum örneklerinde anlatımı yapılmış miRNA sayısı.....	61



<b>Şekil 4.4:</b> Fold change $\geq 2$ olan anlatımı değişmiş miRNA'ların gruplandırılması. ....	62
<b>Şekil 4.5:</b> Gruplar arasında ortak yolakların sayısını gösteren venn şemaları. ....	63
<b>Şekil 4.6:</b> hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-6737-3p anlatım farkı olan miRNA'ların "heat-map" görüntüsü. ....	65
<b>Şekil 4.7:</b> hsa-miR-4665-3p'ün up regüle olduğu gösterilen "box-whisker" görüntüsü. ....	67
<b>Şekil 4.8:</b> Anlatımı değişen miRNA'ların over kanseri ile sağlıklı serum grubunun örneklerinde değişim oranını gösteren hiyerarşik şema görüntüsü. ....	70
<b>Şekil 4.9:</b> Anlatımı değişen miRNA'ların over kanseri ile kist grubunun örneklerinde değişim oranını gösteren hiyerarşik şema görüntüsü. ....	72
<b>Şekil 4.10:</b> Over kanseri ve nüks örnekleri sağlıklıya göre karşılaştırılmasıyla p değeri $>0.005$ ve FC $\geq 2$ olan miRNA'larn anlatım oranlarını gösteren "box-whisker" görüntüsü. ....	77
<b>Şekil 4.11:</b> Over kanseri-nüks ve sağlıklı gruplarında anlatımı değişen miRNA'ların hastalardaki değişimleri. ....	78
<b>Şekil 4.12:</b> Over-nüks ve sağlıklı serum örneklerinde anlatımı değişmiş olan miRNA'lardan p $<0.005$ olan 6 miRNA'nın heat-map görüntüsü. ....	78
<b>Şekil 4.13:</b> Over kanseri-nüks serum örnekleri kiste göre karşılaştırılmasıyla FC $\geq 2$ olan miRNA'larn anlatım oranlarını gösteren "box-whisker" görüntüsü. ....	80
<b>Şekil 4.14:</b> Anlatımları farklı olarak değişmiş olan miRNA'ların (has-miR-3656, has-miR-6125) her grupta değişim oranını gösteren "box-whixker" görüntüsü. ....	81

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Tablo 2.1:</b> Dünya çapına kadınlarda en sık görülen kanser tipleri ve ölüm oranları. ....	6
<b>Tablo 2.2:</b> Tümör baskılayıcı genler ve epitelyal over kanserinde kaybolan fonksiyonları (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008).....	8
<b>Tablo 2.3:</b> Epitelyal over kanserle ilişkili onkogenler (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008)...	10
<b>Tablo 2.4:</b> Epitelyal over kanserinin gelişmesiyle ilişkili risk faktörleri (Chu ve Rubin, 2006).....	14
<b>Tablo 2.5:</b> Over kanserinde kullanılan potansiyel biyobelirteçler (Zhang ve diğ, 2011).....	20
<b>Tablo 2.6:</b> Over kanseri için tümör belirteçleri (Jacobs ve Menon, 2004; Bast Jr., 2003; Chu ve Rubin,2005). ....	22
<b>Tablo 2.7:</b> Epitelyal over kanserinde gen değişimleri .....	24
<b>Tablo 3.1:</b> Çalışmada kullanılan deney grupları. ....	42
<b>Tablo 3.2:</b> “CIP Master Mix” hazırlanması. ....	50
<b>Tablo 3.3:</b> Ligasyon karışımı hazırlanması. ....	51
<b>Tablo 3.4:</b> İşaretleme karışımı.....	51
<b>Tablo 3.5:</b> Yıkama aşamaları. ....	53
<b>Tablo 4.1:</b> Çalışmada kullanılan deney grupları. ....	56
<b>Tablo 4.2:</b> Over kanseri ve kist örneklerinin kalite kontrol sonuçları (*Analiz edilemeyen). ....	58
<b>Tablo 4.3:</b> Nüks ve sağlıklı örneklerinin kalite kontrol sonuçları.....	58
<b>Tablo 4.4:</b> Deney gruplarının beraber değerlendirilmesiyle elde edilen ortak olarak anlatımı değişen miRNA sayısı; Fold change $\geq$ 2 olan ortak miRNA, hedefledikleri gen sayısı ve genlerin yer aldığı yolların sayısı. ....	62
<b>Tablo 4.5:</b> Nüks-Kist gruplarının (t-test corrected p-value cut-off $>0.05$ ) değerlendirmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA’lar, p-değerleri, regülasyonu, FC değeri, kromozom ve aktif dizisi. (~ ile işaretli olanlar FC $\geq$ 2 olan miRNA’lar). ....	64
<b>Tablo 4.6:</b> Over-Kist gruplarının (t-test corrected p-value cut-off $>0.05$ ) değerlendirmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA’lar, p-değerleri, regülasyonu, FC değeri, kromozom ve aktif dizisi. (~ile işaretli olanlar FC $\geq$ 2 olan miRNA’lar). ....	65

<b>Tablo 4.7:</b> Nüks-over gruplarının (t-test corrected p-value cut-off >0.05) değerlendirmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA'lar, p-değerleri, regülasyonu, FC değeri, aktif dizisi. ....	66
<b>Tablo 4.8:</b> Nüks-Over-Kist gruplarının (ANOVA testi corrected p-value cut-off >0.05) değerlendirmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA, p-değeri, regülasyonu, FC değeri, aktif dizisi. ....	66
<b>Tablo 4.9:</b> Serum örnekleri grupları arasında anlatımı değişen miRNA sayısı, bu miRNA'lardan FC>=2 olanların sayısı, hedefledikleri gen sayısı, genlerin yer aldığı yolak sayısı. ....	68
<b>Tablo 4.10:</b> Over kanseri ile sağlıklı örnekler arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	69
<b>Tablo 4.11:</b> Over kanseri ile basit over kisti örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	71
<b>Tablo 4.12:</b> Over kanseri ile nüks serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	73
<b>Tablo 4.13:</b> Basit over kisti ile nüks serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	73
<b>Tablo 4.14:</b> Basit over kisti ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	74
<b>Tablo 4.15:</b> Nüks ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	75
<b>Tablo 4.16:</b> Over kanseri-Nüks ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi (~ p<0.005 ve FC>=2 olan miRNA'lar). ....	75
<b>Tablo 4.17:</b> Over kanser-nüks ve kist grupları arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi. ....	79
<b>Tablo 4.18:</b> Tüm gruplarda ortak olarak anlatımı değişmiş miRNA'larının her gruba göre regülasyonu, FC katsayısı, p değeri ve aktif dizisi. ....	81

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

### Simgeler Açıklama

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>ng</b>	: Nanogram

### Kisaltmalar Açıklama

<b>3D</b>	: 3 dımension
<b>A</b>	: Adenin
<b>ABL1</b>	: ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
<b>aCGH</b>	: Array comparative genomic hybridisation
<b>ADP</b>	: Adenosine diphosphate
<b>AFP</b>	: Alpha-fetoprotein
<b>AKT2</b>	: AKT serine/threonine kinase 2
<b>ANGPT2</b>	: Angiopoietin 2
<b>ANOVA</b>	: Analysis of Variation
<b>APC</b>	: Adenomatous polyposis coli
<b>ARHI</b>	: DIRAS family GTPase 3
<b>ARL11</b>	: ADP ribosylation factor like GTPase 11
<b>ATG9A</b>	: Autophagy related 9A
<b>AURKA</b>	: Aurora kinase A
<b>BCL2L13</b>	: BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)
<b>BHCG</b>	: Beta HCG hormone
<b>BRAF</b>	: V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog
<b>BRCA1</b>	: Breast cancer 1
<b>BRCA2</b>	: Breast cancer 2
<b>C</b>	: Sitozin
<b>CA-125</b>	: Cancer antigen 125
<b>CADM2</b>	: Cell adhesion molecule 2
<b>CCND1</b>	: Cyclin D1
<b>CCNE1</b>	: Cyclin E1
<b>CD44</b>	: CD44 molecule
<b>CDH13</b>	: Cadherin 13
<b>CDKN</b>	: Cyclin-dependent kinase inhibitor
<b>cDNA</b>	: Complementary DNA
<b>CLDN3</b>	: Claudin 3
<b>COL18A1</b>	: Collagen type XVIII
<b>COL18A1</b>	: Collagen type XVIII alpha 1
<b>CRP</b>	: C-reactive protein, pentraxin-related

<b>CT</b>	: Computed tomography
<b>CTC</b>	: Circulating tumor cells
<b>ctDNA</b>	: Circulating tumor DNA
<b>CTNNB1</b>	: $\beta$ -catenin 1
<b>ctRNA</b>	: Circulating tumor RNA
<b>CYP1B1</b>	: Cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1
<b>DAB2</b>	: Disabled 2, mitogen-responsive phosphoprotein
<b>DAPK1</b>	: Death-associated protein kinase
<b>DGCR8</b>	: DiGeorge syndrome critical region gene 8
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	: Distile su
<b>Dk</b>	: Dakika
<b>DLEC1</b>	: Deleted in lung and esophageal cancer 1
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonucleicacid
<b>DPH1</b>	: Diphthamide biosynthesis 1
<b>DTT</b>	: Dithiothreitol
<b>E2F1</b>	: E2F transcription factor 1
<b>E2F2</b>	: E2F transcription factor 2
<b>EGF</b>	: Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	: Epidermal growth factor receptor
<b>EIF5A2</b>	: Eukaryotic translation initiation factor 5A2
<b>EOK</b>	: Epitelyal over kanseri
<b>EpCAM</b>	: Epithelial cell adhesion molecule
<b>ERBB2</b>	: Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
<b>EVI1</b>	: Ecotropic viral integration site 1
<b>FASLG</b>	: Fas ligand
<b>FC</b>	: Fold change
<b>FDA</b>	: Food and drug administration
<b>FGF1</b>	: Fibroblast growth factor 1
<b>FIGO</b>	: International Federation of Gynecology and Obstetrics
<b>FISH</b>	: Fluorescence in situ hybridization
<b>FOLR1</b>	: Folate receptor 1
<b>FOS</b>	: Fos proto-oncogene, AP-1 trancription factor subunit
<b>G</b>	: Guanin
<b>GC-TOF MS</b>	: Gas chromatography/time-of-flight mass spectroscopy
<b>GE Buffer</b>	: Gene Expression Wash Buffer
<b>GPI</b>	: Glucose-6-phosphate isomerase
<b>GRB2</b>	: Growth factor receptor bound protein 2
<b>GTP</b>	: Guanosine triphosphate
<b>HCG</b>	: Human chorionic gonadotropin
<b>HE4</b>	: WAP four-disulfide core domain 2
<b>HER-2</b>	: Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
<b>HRT</b>	: Hormon replasman tedavisi
<b>ICAM1</b>	: Intracellular adhesion molecule 1
<b>IGF2</b>	: Insulin-like growth factor 2
<b>IL</b>	: Interleukin
<b>ITGB3</b>	: Integrin subunit beta 3
<b>İ.Ü.</b>	: İstanbul Üniversitesi
<b>K</b>	: Basit over kisti

<b>KIT</b>	: KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
<b>KRAS</b>	: V-K1-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<b>LDH</b>	: Lactat dehydrogenase
<b>LNA</b>	: Locked nucleic acids
<b>LOH</b>	: Loss of heterozygosity
<b>MAPK</b>	: Mitogen-activated protein kinase
<b>MCSF</b>	: Colony stimulating factor 1
<b>miRNA</b>	: MicroRNA
<b>MLH1</b>	: MutL homolog 1
<b>MMR</b>	: Mismatch repair
<b>MRI</b>	: Magnetik rezonans görüntüleme
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA
<b>MS</b>	: Mass spectoroscopi
<b>MSH2</b>	: MutS homolog 2
<b>MUC2</b>	: Mucin 2
<b>MUC2</b>	: Mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming
<b>MYC</b>	: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>N</b>	: Nüks over kanseri
<b>NGS</b>	: Next-generation sequencing
<b>NMR</b>	: Nuclear magnetic resonance
<b>O</b>	: Over kanseri
<b>OPCML</b>	: Opioid binding protein/cell adhesion molecule-like
<b>OPCML</b>	: Opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like
<b>P14ARF</b>	: p14ARF protein
<b>p16INK4a</b>	: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>PACT</b>	: Protein Kinase R-activating protein
<b>PCR</b>	: Polimerase chain reaction
<b>PCSK6</b>	: Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
<b>PEG3</b>	: Paternally expressed 3
<b>PET</b>	: Pozitron emisyon tomografi
<b>PI3</b>	: Peptidase inhibitor 3
<b>PI3K</b>	: Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PIK3CA</b>	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
<b>PIK3CB</b>	: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta
<b>PIK3RI</b>	: Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
<b>PLAGL1</b>	: PLAG1 like zinc finger 1
<b>PLAGL1</b>	: Pleiomorphic adenoma gene-like 1
<b>Pri-miRNA</b>	: Primer microRNA
<b>PRKCI</b>	: Protein kinase C iota
<b>PRKCI</b>	: Protein kinase C, iota
<b>PRKCI</b>	: Protein kinase C <sub>i</sub>
<b>PTEN</b>	: Phosphatase and tensin homolog
<b>PTEN</b>	: Phosphatase and tensin homolog
<b>PYCARD</b>	: PYD and CARD domain containing
<b>QC</b>	: Quality control
<b>RAB11FIP2</b>	: RAB11 family interacting protein 2 (class I)
<b>RAB15</b>	: Member RAS oncogene family
<b>RAB25</b>	: RAB25, member RAS oncogene family
<b>RAB27B</b>	: Member RAS oncogene family

<b>RAB33A</b>	: Member RAS oncogene family
<b>RAD51</b>	: RAD51 recombinase
<b>RAN</b>	: Ras related nuclear protein
<b>RASSF1A</b>	: Ras association domain family member 1
<b>RIN</b>	: RNA integrity number
<b>RISC</b>	: RNA-induced silencing complex
<b>RNA</b>	: Ribonucleicacid
<b>ROMA</b>	: Risk of Ovarian Malignancy Algorithm
<b>RPS6</b>	: Ribosomal protein S6
<b>RPS6KA2</b>	: Ribosomal protein S6 kinase 2
<b>RT</b>	: Oda sıcaklığı
<b>RT-PCR</b>	: Reverse transcriptase polymerase chain reaction
<b>S</b>	: Sağlıklı
<b>SAGE</b>	: Serial analysis of gene expression
<b>SAT2</b>	: Spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2
<b>SFN</b>	: Stratifin
<b>SMAD4</b>	: SMAD family member 4
<b>SOCS</b>	: Suppressor of cytokine signalling
<b>SPARC</b>	: Secreted protein acidic and cysteine rich
<b>STAT3</b>	: Signal transducer and activator of transcription 3
<b>SYBR Green</b>	: 2-[N- (3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino] -4-[2,3-dihydro-3-methyl (benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl- quinolinium
<b>T</b>	: Timin
<b>T.C.</b>	: Türkiye Cumhuriyeti
<b>TGFA</b>	: Transforming growth factor, alpha
<b>TGFBR1</b>	: Transforming growth factor beta receptor 1
<b>TNF</b>	: Tumor necrosis factor
<b>TP53</b>	: Tumor protein p53
<b>TRBP</b>	: conjugal transfer protein TrbP, traX family protein
<b>UTR</b>	: Untranslated region
<b>WDR4</b>	: WD repeat domain 4
<b>WWOX</b>	: WW domain containing oxidoreductase

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

## OVER KANSERİNDE MİRNA ANALİZİ İLE MOLEKÜLER TANI VE İZLEME

ECE GÜMÜŞOĞLU

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Danışman : Doç. Dr. Tuba GÜNEL

Over kanseri kadın ölümlerine neden olan birinci sıradaki jinekolojik kanserdir. Epitelyal over kanseri (EOK) ölüm oranı en yüksek over kanseri çeşididir. EOK genellikle asemptomiktir ve uygun tarama testlerinin sayısı azdır. Hastalık %70 oranda ileri evrelerde (evre III ve IV) teşhis edilir ve 5 yıllık sağ kalım oranı %30'dan azdır. Evre I'de tanısı koyulan EOK'li olguların 5 yıllık sağ kalım oranı %90'a, evre II'de teşhis edilen olguların ise %70'e kadar çıkar. Bu nedenle EOK'nin erken teşhisi klinikte çok büyük önem taşır. Bu çalışmada miRNA'lar aracılığı ile over kanserinin erken teşhisi amaçlanmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA) insan hastalıklarının tanısında kullanılan ve plazmada saptanan küçük düzenleyici RNA ailesidir. Spesifik mRNA'ların susturulmasında etkili olan miRNA'lar gen anlatımını transkripsiyon sonrası düzenleyen, protein kodlamayan RNA'lardır. Over kanserinde miRNA anlatımı genelde düzensiz olmasına rağmen, kanserle ilişkili miRNA'larda mutasyonlara daha nadir rastlanır. Yapılan çoğu çalışmada normal over epiteli ile over kanserindeki miRNA profili arasında fark olduğu gösterilmiştir.

Yaptığımız tez çalışmasında, epitelyal over kanseri olan vakalarda, over kanseri geçirip tedavi sonrasında tekrarlayan (nüks) olgularda, basit over kisti vakalarında ve sağlıklı



bireylerde miRNA anlatım profilleri karşılaştırılmıştır. Sağlıklı grup hariç diğer gruplardan hem doku hem serum örneği, sağlıklılardan ise sadece serum örneği toplanmıştır. Basit over kisti dokuları, kontrol olarak kullanılırken; sağlıklı serumları, serum grubunda kontrol olarak kullanılmıştır. Doku örneklerinin ikili ve üçlü karşılaştırılması sonucunda toplam 6 tane anlamlı olarak değişmiş (p değeri 0.05'den küçük ve anlatım değişme katsayısı 2'den büyük olan) miRNA (hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-6737-3p, hsa-miR-3656, hsa-miR145-5p, hsa-miR-320e) tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hedeflediği genlere ve yollarına göre analiz yapıldığında kanserle ilişkileri belirlenmiştir.

Serum örneklerinde ikili, üçlü ve dörtlü gruplandırılmış örneklerde miRNA anlatım analizinde anlamlı olarak değişen (p değeri 0.05'den küçük ve anlatım değişme katsayısı 2'den büyük olan) 12 tane miRNA (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-3646, hsa-miR-3656, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-6775-3p, hsa-miR-6794-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR1234-3p, hsa-miR-6125, hsa-miR-7108-5p, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-449c-3p) tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hedeflediği genlere ve yollarına göre analiz yapıldığında kanserle ilişkili oldukları görülmüştür.

EOK'un erken tanısına yönelik miRNA'larla uluslararası düzeyde bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. EOK'un moleküler tanı yöntemleri aracılığıyla tanımlanmasına yönelik rutin bir uygulama olmadığı gibi nüks-over kanseri ve basit over kistinde meydana gelen miRNA anlatım değişikliklerinin birlikte mikroarray ile tarandığı literatüre rastlanmamıştır. Araştırma sonuçlarımıza göre mikroarray ile tespit ettiğimiz miRNA'ların validasyonu yapılarak %90 olan 5 yıllık sağ kalım oranına erişebilme mümkün olacaktır.

Haziran 2016, 122 sayfa

**Anahtar kelimeler:** over kanseri, miRNA, mikroarray, moleküler tanı

## **SUMMARY**

**M.Sc. THESIS**

### **MOLECULAR DIAGNOSIS AND SURVEILLANCE IN OVARIAN CANCER BY MIRNA ANALYSIS**

**Ece GÜMÜŞOĞLU**

**Istanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Molecular Biology and Genetics Department**

**Supervisor : Assoc.Prof.Dr.Tuba GÜNEL**

Ovarian cancer is first gynecologic cancer that causes women death and epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal ovarian cancer type. EOC is usually asymptomatic and few screening tests are available, almost 70% of women present with advanced-stage (stage III or IV) disease, with 5-year survival rates of less than 30%. Patients who are diagnosed with stage I disease have a 5-year survival rate of up to 90%, and patients with stage II disease have a 5-year survival rate of up to 70%. Therefore, early detection of EOC has a great importance in clinic. In this study, early diagnosis of ovarian cancer by miRNA is aimed.

MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory RNA family found in plasma and used for diagnosis of human diseases. miRNAs are non-coding RNAs that represses specific mRNAs and regulates post-transcriptional gene expression. Although miRNA expression is irregular in ovarian cancer, mutations are found rarely in cancer related miRNAs. Several studies showed that different miRNA profile between normal ovarian epithel and ovarian cancer.

In this thesis study, miRNA expression profiles have been compared between patients suffering ovarian cancer, recurrence ovarian cancer after treatment, simple ovarian cysts and healthy individuals. Either tissue and serum samples were collected from whole groups except healthy individuals. From healthy group, only serum samples were attained. While, simple ovarian cysts tissues have been used as a control group; healthy serums have been used as a control group between serum samples. In the results of comparison of miRNA expressions profiles in between two and three tissue groups; 6

significantly (p value is smaller than 0.005 and fold change is greater than 2) altered expression levels miRNAs (hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-6737-3p, hsa-miR-3656, hsa-miR145-5p, hsa-miR-320e) have been detected. Relations of genes and pathways with cancer can be determined, when the target genes and pathways of these miRNAs were analyzed.

In the results of comparison of miRNA expressions profiles in between two, three and four serum groups; 12 significantly (p value is smaller than 0.005 and fold change is greater than 2) altered expression levels miRNAs (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-3646, hsa-miR-3656, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-6775-3p, hsa-miR-6794-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-1234-3p, hsa-miR-6125, hsa-miR-7108-5p, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-449c-3p) have been detected. Relations of genes and pathways with cancer can be determined, when the target genes and pathways of these miRNAs were analyzed.

Scientific researches about early detection of EOC by miRNA are performed international level. There is not routine application for detect EOC with molecular diagnostic methods yet. Besides, any other study that screens the altered miRNA expression level on ovarian cancer, recurrent ovarian cancer and simple ovarian cyst samples together; is found in between the previous studies. As a result of our study, with the detected altered miRNAs validation, it will be possible to reach 90% of 5-year survival rate.

June 2016, 122 pages

**Keywords:** over cancer, miRNA, microarray, molecular diagnosis

## 1. GİRİŞ

Over kanseri, ovaryumlarda başlayan ve genelde vücuda yayılan bir kanser türüdür (Edmondson ve diğ, 2001). Hayatta kalma oranı düşük olan ve hızlı yayılma gösteren heterojen bir hastalıktır<sup>1</sup> ve jinekolojik kanser kaynaklı ölümlerin en önemli nedenidir (Chu ve Rubin, 2005). Dünyada kadınlar arasında kanserle ilişkili ölümlerin beşinci önemli nedeni olarak gösterilir (Alain, 2008). Over kanserinin geç evrelere kadar asemptomik olması ve hastalığın erken evrelerinde tanı koyulabilmesi için etkili bir tarama testinin henüz bulunmaması nedeniyle hastalık tanısı erken evrelerde yapılamamaktadır. Bunun bir sonucu olarak da 5 yıllık sağ kalım oranı %45'i geçememektedir (American Cancer Society, 2011). Kullanılan birçok tanı yöntemine rağmen over kanserinin erken tanısı kesin olarak yapılamamakta ve ileri yöntemlerle geliştirilmesi gerekmektedir. Mümkün olan en az girişimsel işlemle over kanserinin tanısı için spesifik biyobelirteçlerin kullanılması çok önemlidir. Bu nedenle over kanserine yüksek hassasiyet gösteren erken tanı biyobelirteçlerinin tanınması ve validasyonu yapılması gerekir. Bu bağlamda yaptığımız çalışma ileri validasyonlarla birleştirilmek şartıyla biyobelirteç belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı epitelyal over kanseri olan vakalarda, over kanseri geçirip tedavi sonrasında tekrarlayan (nüks) olgularda, basit over kisti vakalarında; kan plazmasından ve tümör dokusundan elde edilen miRNA'ların anlatım miktarını ölçmek ve sonuçları aynı yaş aralığındaki sağlıklı örneklerin plazmalarından elde edilen miRNA profilleriyle ve birbiriyle de karşılaştırmaktır. Elde edilen değerlerden yola çıkılarak anlatımlarında düşüş veya artış olan miRNA'ların mantıksal anlatım değişikliğine dayanarak biyobelirteç olarak erken tanı amaçlı kullanmaktır. Bu çalışma sonucunda elde edilen anlatım değişikliği analizine göre miRNA'lar ile over kanserinin arasındaki ilişki tespit edilmiştir.

---

<sup>1</sup> <http://medicine.yale.edu/cancer/patient/programs/breast/info/info.aspx?id=cdr62855>

<sup>2</sup> <http://medicine.yale.edu/cancer/patient/programs/breast/info/info.aspx?id=cdr62855>

## 1.1. OVER KANSERİ

Ovaryum dokusu pek çok değişik hücreden oluşur. Bunlar ovaryumun iç kısmını örten ve overleri üreten üreme (germ) hücreleri, östrojen ve progesteron hormonlarının büyük kısmını üreten stromal hücreler ve ovaryumun dış kısmını örten epitelyal hücrelerdir (Dina ve diğ, 2002). Her hücre tipinden farklı türde tümör gelişebilir. Bu tümörler epitelyal tümörler, germ hücreli tümörler (over hücresi ve folikülden köken alan) ve stromal tümörlerdir. Over kanserlerinde ilk ayırım hücre sınıfına göre epitelyal ve non-epitelyal over kanserleri olarak 2 grupta yapılır. Daha sık görülen epitelyal over tümörleri: seröz tümörler, müsinöz tümörler, endometrioid tümörler, berrak hücreli tümörler, Brenner tümörleri, indiferansiye karsinomlar, mikst epitelyal tümörler. Non-epitelyal ovaryum tümörleri: granüloza hücreli tümörler, germ hücreli tümörler, sarkomlar, lenfomalar (Berek, 2004). Bu tümör tiplerinin moleküler ve hücresele düzeyde analizleriyle over kanserinin erken tanısına yönelik çalışmalar yürütülebilir ve uzun süreli sağ kalım oranı artırılabilir. Over kanseri oluşumunda birçok etken rol oynarken genomda meydana gelen mutasyonlar ve epigenetik değişimler çok önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle mutasyonlara ve epigenetik değişimlere yönelik çalışmalarla hastalığın erken tanısı, seyri, tedaviye yanıtı gibi özellikler hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Over kanseri, dünya genelindeki kadınlarda kanser nedeniyle gerçekleşen ölümlerin beşinci sebebidir ve belirli bir nüfusta belirli bir zaman dilimi içerisinde yeni olgularının sayısı (insidansı) gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. Ülkemizde, T.C. Sağlık Bakanlığının 2009'da yayınladığı sağlık istatistikleri verilerine göre, over kanseri Türk kadınlarında görülen kanserler içerisinde 7. sırada yer almaktadır (Köse ve diğ, 2014). Over kanseri riskini artıran etmenler ileri yaş, genetik olarak yatkınlık, infertil olma ya da fertilitate tedavisi görmek, hormon replasman tedavisi (HRT) görmek, fazla kilolu ve uzun olma, endometriyozis, pelvik enflamatuvar hastalığı, polikistik over sendromu, doğum kontrol haplarının daha az kullanımı, talk pudrası vb. olarak sıralanabilir.

## 1.2. OVER KANSERİ TANISI

Over kanserinin tanısı spesifik olmayan semptomlar nedeniyle zordur (Roett ve Evans, 2009). Semptomatik ve asemptomatik over kanserlerinin tanısında birçok yöntem kullanılır. Pelvik muayene, transvajinal görüntüleme ve CA-125 (cancer antigen-125) testleri over kanseri tanısında kullanılan standart yöntemlerdendir. Ama bu yöntemlerin özgüllüğü ve hassaslığı erken evrede tanı için yeterli değildir. Bu nedenle moleküler kan testleri ile bu metotlar birleştirilerek erken evrede daha hassas ve doğru tanı yöntemleri geliştirilmelidir. Bu bağlamda moleküler biyobelirteçler büyük önem taşımaktadır. Over kanseri tanısında protein, gen, metabolit, mikroRNA temelli biyobelirteçler kullanılır. Günümüzde en sık kullanılanı protein temelli belirteçlerdir çünkü gen temelli olanların proteine olan etkileri bilinmemektedir. Henüz yeni yöntem olarak yavaş yavaş kullanılmaya başlayan mikroRNA temelli belirteçler de mRNA hedeflerinin anlatımlarını değiştiren ve anlatım yapmayan küçük RNA'lar olarak over kanseri tanısında yerini almaktadır. Anlatımları değişen mikroRNA'ların kandan tespit edilmesiyle erken evrede over kanseri tanısı yapılabilecek ayrıca hastalığın ilerlemesi, tedaviye yanıtı ve evresi de tespit edilebilecektir. Şuanda gelişmekte olan bir alan olduğu için daha fazla çalışmaya ve validasyonlara gereksinim vardır. Ayrıca birden fazla biyobelirtecin kullanıldığı over kanseri panelleri oluşturularak tanıya yönelik araştırmalar da yapılmaktadır. Bu çalışmada over kanserinin erken tanısını yapmak üzere miRNA'lar araştırılmış ve en az girişimsel yöntemler kullanılarak yapılacak tanı yöntemlerinden olan kandan over kanseri tanısına katkı sağlanmıştır.

Non-invasiv tümör tanı ve taraması tıpta önemli bir yaklaşım haline gelmiştir. Dokudan biyopsinin aksine dolaşan tümör hücrelerinin (circulating tumor cells-CTCs) ve tümör nükleik asitlerinin tespiti (circulating tumor DNA/RNA) ile en az invasiv metotla prediktif ve prognostik belirteçler belirlenebilir. Bu çalışmada da periferik kanda serbest dolaşan miRNA'lar kullanılarak over kanseri tanısı amaçlanmıştır.

Over kanseri tanısında birçok moleküler yöntem kullanılır. miRNA'ların analizinde kullanılan belli başlı yöntemler revers-transkripsiyon kantitatif PCR(polimerase chain reaction, polimeraz zincir reaksiyonu), in-situ hibridizasyon, mikroarray ve yeni nesil dizilemedir. Aday miRNA'ların tanımlanması için mikroarray temelli anlatım analizleri

ideal bir tekniktir çünkü istenilen yüzlerce örnekte miRNA anlatım analizi yapılabilir ve “high-throughput” veri elde edilebilir (Aldridge ve Hadfield, 2012). MiRNA mikroarray teknolojisi normal ve tümör örnekleri arasındaki miRNA anlatım farklarını tespit etmek için çok güçlü bir tekniktir (Iorio ve diğ, 2007; Iorio ve diğ, 2005; Calin ve Croce; 2006, Esquela-Kerscher ve Slack, 2006). Ayrıca belirli bir klinik ve patolojik özellik ya da hastalık etkisi miRNA anlatım analizi ile tespit edilebilir (Calin ve diğ, 2005; Yanaihara ve diğ, 2006). Bu nedenlerden dolayı yapılan tez çalışmasında miRNA analizi için mikroarray yöntemi kullanılmıştır.

### **1.3. MALZEME VE YÖNTEM**

Araştırmamızdaki örnekler; sağlıklı bireylerden, primer epitelyal over kanser teşhisi konulmuş hastalardan, daha önce over kanser geçmişi olup tekrar nüks etmiş hastalardan ve basit over kisti bulunan hastalardan toplanmıştır. 2 deney (over kanseri ve nüks) ve 2 kontrol (basit over kisti ve sağlıklı) olmak üzere toplam 4 araştırma grubuyla çalışılmıştır. Sağlıklı grup hariç diğer araştırma gruplarından hem periferel kandan elde edilen serum hem de tümör (ya da kist) dokuları alınmıştır. Sağlıklı grubundan sadece serum alınmıştır. Alınan periferel kanlar ve dokular aynı gün soğuk zincir ile İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Tanı ve Analiz Birimi laboratuvarına transfer edilmiştir. Bu çalışmada toplanan serum ve tümör veya kist dokularının tümünden izolasyon yapılmış ve elde edilen RNA’lardan kalitesi en yüksek olan 8’er örnek ileriki aşamalarda kullanılmak üzere nanodrop ve biyoanalizör teknikleriyle değerlendirilerek seçilmiştir. Uygun değerdeki miRNA’lar “Agilent” miRNA mikroarray sistemi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında anlatım farkı bulunan miRNA’lar biyoinformatik yöntemlerle elde edilmiştir. Bu miRNA’lar arasında en anlamlı olanlar seçilmiş ve ilgili olduğu hedef genler, yolaklar belirlenmiştir. Ayrıca anlatım farkı olan miRNA’lar üzerine yapılmış literatürler taranmış ve kanserle ilişkileri belirlenmiştir.

#### 1.4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Analizler serum ve doku olmak üzere iki gruba ayrılarak yapılmıştır. Doku örneklerinde anlatımı değişen miRNA'lar over-nüks ve kist dokularında karşılaştırılmıştır. Bu grupta kist grubu kontrol olarak alınmıştır. Doku örneklerinin ikili ve üçlü karşılaştırılması sonucunda toplam 6 tane anlamlı olarak değişmiş (p değeri 0.05'den küçük ve anlatım değişme katsayısı 2'den büyük olan) miRNA (hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-6737-3p, hsa-miR-3656, hsa-miR145-5p, hsa-miR-320e) tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hedeflediği genlere ve yolaklarına göre analiz yapıldığında kanserle ilişkili oldukları tespit edilmiştir.

Serum örneklerinde ikili, üçlü ve dörtlü gruplandırılmış örneklerde miRNA anlatım analizi yapılmıştır. Anlatımı anlamlı olarak değişen (p değeri 0.05'den küçük ve anlatım değişme katsayısı 2'den büyük olan) 12 tane miRNA (hsa-miR-1909-5p, hsa-miR-3646, hsa-miR-548am-5p, hsa-miR-6775-3p, hsa-miR-6794-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR1234-3p, hsa-miR-6125, hsa-miR-7108-5p, hsa-let-7d-3p, hsa-miR-449c-3p) belirlenmiştir. Bu miRNA'ların hedeflediği genlere ve yolaklarına göre analiz yapıldığında kanserle ilişkili oldukları görülmüştür.

Literatürde kanserle ilişkisine rastlanmayan miRNA'ların herbiri potansiyel yeni bir biyobelirteç özelliği taşımaktadır. Anlamlı anlatım değişikliği gösteren bu miRNA'ların validasyonlar, hedef mRNA'lar ve proteinler bazında yapılan analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. Over kanseriyle ilişkisi kanıtlanmış olan miRNA'lar ise biyobelirteç olarak over kanserinin veya nüks etmiş over kanserlerinin erken tanı panellerine eklenerek bu ölümcül hastalığın ölüm oranını azaltmak için kullanılabilir.

Çağın hastalığı olan kanserin tedavi stratejilerinin değişmesi ve gelişmesi moleküler anlamda daha çok bilginin elde edilmesi ile mümkündür. Bu tez kapsamında jinekolojik kanserlerde ölüm oranı en fazla olan over kanserinin tanısında biyobelirteç olarak saptamaya çalıştığımız miRNA'lar literatüre katkı sağlayacağı gibi çalışılan hasta sayılarının artırılarak belirlediğimiz miRNA'ların "Real-time PCR("polymerase chain reaction")" ile validasyonları ile biyobelirteç olarak kullanımları gerçek olabilecektir.



## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. OVER KANSERİ VE GELİŞİMİ

Over kanseri, ovaryumlarda başlayan ve genelde vücuda yayılan bir kanser türüdür (Edmondson ve diğ, 2001). Hayatta kalma oranı düşük olan ve hızlı yayılma gösteren heterojen bir hastalıktır<sup>2</sup> ve jinekolojik kanser kaynaklı ölümlerin en önemli nedenidir (Chu ve Rubin, 2005). Dünyada kadınlar arasında kanserle ilişkili ölümlerin beşinci önemli nedeni olarak gösterilir (Alain, 2008) (Tablo 2.1.). Ovaryum kanserinin geç evrelere kadar asemptomik olması ve hastalığın erken evrelerinde tanı koyulabilmesi için etkili bir tarama testinin henüz bulunmaması nedeniyle hastalık tanısı erken evrelerde yapılamamaktadır. Bunun bir sonucu olarak da 5 yıllık sağ kalım oranı %45'i geçememektedir (American Cancer Society, 2011).

**Tablo 2.1:** Dünya çapına kadınlarda en sık görülen kanser tipleri ve ölüm oranları.

Kanser tipleri	İnsidans(%)	Ölüm Oranı(%)
Akciğer Kanseri	18,6	13,6
Endometriyum Kanseri	12,8	2,4
Kolorektal Kanseri	24,2	92
Meme Kanseri	66,4	15,3
Ovaryum Kanseri	9,4	5,1

Over kanserinin tanısı spesifik olmayan semptomlar nedeniyle zor olabilmektedir (Roett ve Evans, 2009). En genel semptomları şişkinlik, pelvik ve abdominal ağrı, zor yeme ya da çabuk doyma, acil veya sık idrara çıkma isteğidir.

#### 2.1.1. Over Kanseri Biyolojisi

Overler, pelviste uterusun her iki yanında birer tane bulunmaktadır. Şekil ve ölçü olarak iri bir badem görünümündedirler. 4 cm uzunlukta, 2 cm genişlikte ve 1 cm kalınlığındadırlar. Her biri uterus fallop tüpleri ile bağlıdır. İşlevleri, over hücresinin

<sup>2</sup> <http://medicine.yale.edu/cancer/patient/programs/breast/info/info.aspx?id=cdr62855>

olgunlaşp ovaryumlardan atılması (ovulasyon) ile üreme siklusunda görevli östrojen ve progesteron hormonlarını salgılamaktır.

Ovaryum dokusu pek çok değişik hücreden oluşur. Bunlar ovaryumun iç kısmını örten ve overleri üreten üreme (germ) hücreleri, östrojen ve progesteron hormonlarının büyük kısmını üreten stromal hücreler ve ovaryumun dış kısmını örten epitelyal hücrelerdir (Dina ve diğ, 2002). Her hücre tipinden farklı türde tümör gelişebilir (Şekil 2.1.). Bu tümörler epitelyal tümörler, germ hücreli tümörler (over hücresi ve folikülden köken alan) ve stromal tümörlerdir. Epitelyal tümörler over dış yüzeyini örten epitel hücrelerden kökenlenir. Germ hücre tümörleri overden türevlenirler. Stromal tümörler ise over hücrelerini bir arada tutan, dişi hormonları, progesteron ve östrojen üreten yapısal hücrelerden oluşur. Bu tümörlerin çoğu iyi huylu tümörlerdir ve over dışına dağılmazlar. İyi huylu tümörler overin tamamının ya da tümör içeren bir kısmının alınmasıyla tedavi edilebilir. Kötü huylu olan tümörler ise metastaz yapabilir ya da ölümcül olabilir (American Cancer Society, 2011). Nonspesifik bağ dokusu hücrelerinden köken alan tümörler ve başka bir organdan metastaz yolu ile gelen tümörlerdir (Edmondson ve diğ, 2001).



**Şekil 2.1:** Normal over ile over kanserinin fiziksel olarak karşılaştırılması.

Uzun süreli sağ kalımı arttırmak; moleküler ve hücresel düzeyde edinilen bilgilerin kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinde ve erken tanı için kullanılmasıyla sağlanabilir. Bu nedenle over kanserinin moleküler ve hücresel düzeyde analizi sağ kalım oranını arttırmak için önemlidir (Bast ve diğ, 2009).

Over kanseri heterojendir ve over kanseri olan hastalarda çoklu genetik ve epigenetik değişimler belirlidir fakat o değişimlerin nasıl seçildiği hala tam olarak anlaşılmamıştır.

*TP53* fonksiyonunda mutasyon ve kayıp over kanserinde en sık görülen genetik anomalilerinden biridir; sporadik ve ailesel vakaların %60-80'inde görülür. Over kanserinde bugüne kadar keşfedilen 16 tümör baskılayıcı genden 3 tanesi “imprint” genidir. Çoğu büyüme inhibe edici gen ise metilasyonla susturulmuş veya “imprint” haldedir. Tablo 2.2.’de tümör baskılayıcı genler ve epitelyal over kanserinde kaybolan fonksiyonları gösterilmiştir. DNA tamir mekanizmasında meydana gelen hasarların; over kanserlerinin %10-15’inde kalıtıldığı gözlenmiştir. Mutasyon taşıyan bireylerde hayat boyu over kanseri gelişme riski ise genetik bozukluğa göre farklılık gösterir. Örneğin *BRCA1* (Breast cancer 1) hasarları %30-60 oranla gözlenirken, *BRCA2* (Breast cancer 2) hasarları %15-30 oranıyla gözlenir. En az 15 onkogenin (Tablo 2.3.) over kanserinde rol oynadığı gösterilmiştir ayrıca kodlama yapmayan mikroRNA’lar olarak bilinen bölgelerde DNA kopya sayısı değişimleri gözlenmiştir. En az 7 sinyal yolağı %50’den fazla vakada aktive olmuş; hücre proliferasyon, apoptoz ve otofajide etkili olan mutasyonlar artmıştır (Bast ve diğ, 2009).

**Tablo 2.2:** Tümör baskılayıcı genler ve epitelyal over kanserinde kaybolan fonksiyonları (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008).

Gen	Kromozom	miRNA anlatımının azaldığı ya da inaktif olduğu kanser oranı	Anlatım azalma mekanizması	Fonksiyon
ARHI (DIRAS 3)	1p31	60%	“Imprinting”; “LOH (loss of heterozygosity)”; promotör metilasyonu; E2F1 ve E2F4 ile transkripsiyon azalması	26 kDa GTPaz; proliferasyon ve hareketi inhibe eder; otofaji ve dormansiyi tetikler; P21 anlatımını artar siklin D1, PI3K, Ras–Mapk sinyalleri ve STAT3’i inhibe eder
RASSF1 A	3p21	60%	Hipermetilasyon	Birçok kanserde proliferasyon ve tümörleşmeyi inhibe eder; Ras inhibisyonu, siklin D anlatımının azalması ve JNK sinyalleri ile ilişkilidir; mikrotübülleri stabilize eder; iğ ipliği kontrol noktalarını düzenler; CD95 ve TNFα indüklenmiş apoptozu düzenler
DLEC1	3p22.3	73%	Promotör hipermetilasyon ve histon hipoasetilasyon	Bağlanma bağımlı büyümeyi inhibe eden 166 kDa sitoplazmik protein

**Tablo 2.3 (devam):** Tümör baskılayıcı genler ve epitelyal over kanserinde kaybolan fonksiyonları (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008).

SPARC	5q31	70–90% düşük anlatım; 9% anlatım kaybı	Transkripsiyon	32 kDa Ca <sup>+2</sup> -bağlanma protein, adhezyonu engeller
DAB2 (DOC2)	5q13	58–85% anlatım kaybı	Transkripsiyon	105 kDa protein GRB2'e bağlanır, Ras and Mapk aktivasyonunu engeller; FOS indüklenmesini engeller ve ILK aktivitesini azaltır; anoikis de görev alır; proliferasyonu inhibe eder; bağlanma bağımlı büyümeyi ve tümör gelişimini inhibe eder
PLACL1 (LOT1)	6q25	39%	"Imprinting"; LOH; EGF ve TPA tarafından transkripsiyonun azalması	55 kDa nuclear çinko-parmak protein; proliferasyon ve tümör gelişimini inhibe eder
RPS6K AZ	6q27	64%	Overde monoallelik anlatım; LOH	90 kDa ribozomal S6 serin trionin kinaz; büyümeyi inhibe eder; apoptozu indükler; ERK fosforilasyonu ve siklin D1 azaltır; p21 and p27 arttırır
PTEN	10q23	3–8% mutasyonlu; 27%'sinde anlatım kaybı, özellikle endometrioid ve "clearcell" histotiplerinde	Promoter metilasyon; LOH; mutasyon	PI3 fosfataz; proliferasyonu, göçü ve sağ kalımı azaltır; siklin D'yi azaltır, p27 arttırır.
OPCML	11q25	56–83%	Promotör metilasyon; LOH; mutasyon	GPI-bağlanmış IgLON aile üyelerinin agregasyonunu arttırır; proliferasyon ve tümör gelişimini inhibe eder
BRCA2	13q12–13	3–6%	LOH; mutasyon	DNA DSBs'nin tamiri sırasında RAD51'e bağlanır
ARL11	13q14	62%	Promotör metilasyon	ADP ribozilasyon faktör; apoptozu indükler
WWOX	16q23	30–49%, özellikle müsinöz ve "clearcell" histotiplerinde	LOH; mutasyon	Bağlanma bağımlı büyümeyi ve tümör gelişimini inhibe eder; faredeki homoloğu apoptoz için gereklidir
TP53	17p13.1	50–70%	Mutasyon	53 kDa nüklear protein; hücre döngüsü tutuklanması ve DNA stabilitesinin arttırılmasını sağlayan p21'i indükler, apoptozu indükler

**Tablo 2.4 (devam):** Tümör baskılayıcı genler ve epitelyal over kanserinde kaybolan fonksiyonları (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008).

DPH1	17p13.3	37%	LOH	50 kDa protein; proliferasyonu and klonagenisitiyi azaltır; siklin D1'i azaltır
BRCA1	17q21	6–8%	Mutasyon; LOH	Homolog rekombinasyonda DNA DSBs'nin tamirinde direkt olarak rol alan E3 ubikitin ligaz, ABL1'i regule eder; p53, androjen reseptörü, östrojen reseptörü ve MYC'yi indükler
PEG3	19q13	75%	"Imprinting"; LOH; promotör metilasyonu; transkripsiyon	p53-bağımlı apoptozu indükler

**Tablo 2.5:** Epitelyal over kanserle ilişkili onkogenler<sup>3</sup> (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008).

Gen	Kromozom	Anlatım yaptığı kanser yüzdesi	Anlatımının arttığı o kanser yüzdesi	Mutasyonlu olduğu kanser yüzdesi	Fonksiyonu
<i>RAB25</i>	1q22	54%	80–89%	Belirlenmemiş	Sitoplazmik GTPaz ve apikal damar kaçağı
<i>EVI1</i>	3q26	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Transkripsiyon faktörü
<i>EIF5A2</i>	3q26	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Elongasyon faktörü
<i>PRKCI</i>	3q26	44%	78%	Belirlenmemiş	Sitoplazmik serin-trionin protein kinaz
<i>PIK3CA</i>	3q26	9–11%	32%	8–12%	Sitoplazmik lipid kinaz
<i>FGF1</i>	5q31	Belirlenmemiş	51%	Belirlenmemiş	Kanser ve anjiyogenez için büyüme faktörü
<i>MYC</i>	8q24	20%	41–66%	Belirlenmemiş	Transkripsiyon faktörü
<i>EGFR</i>	7q12	11–20%	9–28%	<1%	Protein tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörü

<sup>3</sup> *AURKA*, aurora kinase A; *CCNE1*, cyclin E1; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *EIF5A2*, eukaryotic translation initiation factor 5A2; *EVI1*, ecotropic viral integration site 1; *FGF1*, fibroblast growth factor 1; *PIK3CA*, *PI3K* catalytic subunit- $\alpha$ ; *PIK3R1*, *PI3K* regulatory subunit polypeptide 1; *PRKCI*, protein kinase C $\gamma$

**Tablo 2.6 (devam):** Epitelyal over kanserle ilişkili onkogenler<sup>4</sup> (Bast ve diğ, 2009; Bast ve diğ, 2008).

<i>NOTCH3</i>	9p13	20–21%	62%	Belirlenmemiş	Hücre yüzeyi büyüme faktörü reseptörü
<i>KRAS</i>	12p11–12	5%	30–52%	2–24%	Sitoplazmik GTPaz
<i>ERBB2</i>	17q12–21	6–11%	4–12%	Belirlenmemiş	Protein tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörü
<i>PIK3R1</i>	19q	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Sitoplazmik lipid kinaz
<i>CCNE1</i>	19q12	12–36%	42–63%	Belirlenmemiş	Siklin
<i>AKT2</i>	19q13.2	12–27%	12%	Belirlenmemiş	Sitoplazmik serin–trionin protein kinaz
<i>AURKA</i>	20q13	10–15%	48%	Belirlenmemiş	Nuklear serin–trionin protein kinaz

Over kanseri genetik değişimler bakımından düşük ve yüksek dereceli tümörler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. *KRAS*, *BRAF* ve *PIK3CA* gen mutasyonları, kromozom Xq bölgesinde heterozigot kaybı (LOH), mikrosatellit instabilitesi ve amfiregulin proteini anlatımı olan tümör tipleri düşük dereceli tümörler; *TP53* hasarları, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde potansiyel hasar, kromozom 7q ve 9p bölgelerinde LOH (“loss of heterozygosity”) görülenler ise yüksek dereceli tümörlerdir (Bast ve diğ, 2009).

Hücre adezyonu ve hareketinde meydana gelen değişimler de over kanserinin gelişmesinde ve metastazında rol oynar. Over kanseri hücrelerinin mezotelyal hücrelere ve alt stromaya adhezyonu kanser hücre yüzeyinde bulunan CD44, CA125 ve b1 integrin ile gerçekleşir. Bu proteinler mezotelyal hücrelerdeki mezotelin ve hiyaluronik asite veya alt stromada fibronektin, laminin ve tip IV kollajenlere bağlanırlar (Bast ve diğ, 2009).

<sup>4</sup> *AURKA*, aurora kinase A; *CCNE1*, cyclin E1; *EGFR*, epidermal growth factor receptor; *EIF5A2*, eukaryotic translation initiation factor 5A2; *EVII*, ecotropic viral integration site 1; *FGF1*, fibroblast growth factor 1; *PIK3CA*, *PI3K* catalytic subunit- $\alpha$ ; *PIK3R1*, *PI3K* regulatory subunit polypeptide 1; *PRKCI*, protein kinase C $\gamma$

## 2.2. OVER KANSERİ İNSİDANSI VE ETİYOLOJİSİ

### 2.2.1. Over Kanseri İnsidansı

Over kanseri, dünya genelindeki kadınlarda kanser nedeniyle gerçekleşen ölümlerin beşinci sebebidir ve belirli bir nüfusta belirli bir zaman dilimi içerisinde yeni olgularının sayısı (insidansı) gelişmiş ülkelerde daha yüksektir. Ovaryum kanseri, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Batı Avrupa ülkelerinde en sık görülen ikinci jinekolojik kanserdir ve kötü huylu tümörlere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir (Allain, 2008; Pearce ve diğ, 2012). 2015’de Amerika Birleşik Devletleri’nde yapılan araştırmaya göre 21,290 over kanseri vakası olduğu tahmin edilmektedir ve yaklaşık 14,180 ölüm olduğu gösterilmiştir (Siegel ve diğ, 2015). Ülkemizde, T.C. Sağlık Bakanlığının 2009’da yayınladığı sağlık istatistikleri verilerine göre, overyum kanseri Türk kadınlarında görülen kanserler içerisinde 7. sırada yer almaktadır (Köse ve diğ, 2014) (Şekil 2.2.).

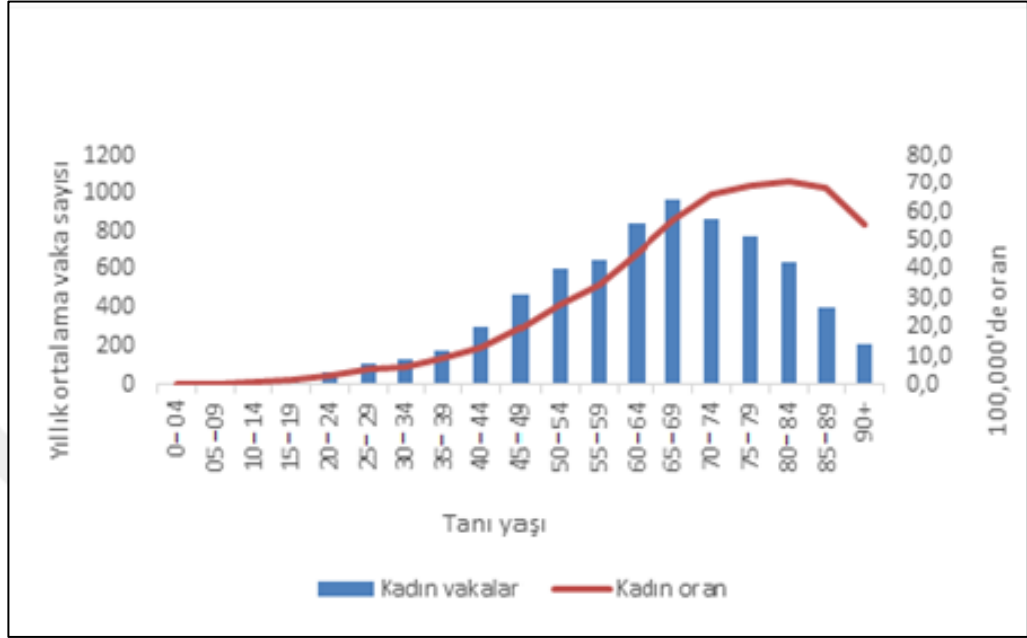
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Meme	31,9	33,9	34,7	35,0	37,6	35,9	40,7	40,6
Tiroid	3,5	5,1	7,3	9,6	10,8	14,4	16,2	18,6
Kolorektal	9,3	10,3	11,3	11,1	12,5	12,3	13,2	13,4
Uterus Korpusu	4,3	5,9	7,6	7,1	8,4	8,7	8,6	9,3
Trakea, Akciğer ve Bronş	5,2	5,8	7,4	7,4	7,7	7,8	8,2	8,1
Mide	6,0	6,9	6,4	6,9	7,6	8,4	7,7	8,1
Over	5,9	6,2	5,8	5,6	5,9	6,5	6,9	6,9
Non-Hodgkin Lenfoma	1,2	1,4	4,4	4,0	4,9	5,2	5,0	5,3
Beyin, Diğer Sinir Sistemi	3,8	4,2	3,6	4,0	4,6	4,6	4,4	5,0
Uterus Serviksi	3,9	4,7	4,5	4,4	4,8	4,3	4,1	4,5

**Şekil 2.2:** Yıllara göre kadınlarda en sık görülen 10 kanser türünün insidansı, (100.000’de, Dünya Standart Nüfusu), Türkiye (Köse ve diğ, 2014).

Hastalık toplumda 50-60 yaşları arasında en yüksek oranda görülür ve 70’li yaşlara kadar yaşla birlikte görülme sıklığı da artmaktadır<sup>5</sup> (Şekil 3). Over kanseri, hastalığın geç evrelerine kadar semptomlarını göstermemesi nedeniyle “sessiz katil” (“silent

<sup>5</sup><http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/ovarian-cancer/incidence#heading-One>. [Ziyaret tarihi: 14.03.2016]

killer”) olarak adlandırılmaktadır ve geç evrelere kadar asemptomik olması nedeniyle hastaların yaklaşık %45’inden azında erken tanı mümkündür (Kindelberger ve diğ, 2007).



Şekil 2.3: Over kanserinin yaşa göre görülme sıklığı, yıllık vaka sayısı ve oranları.

### 2.2.2. Over Kanseri Etiyolojisi

Over kanseri hiç doğum yapmamışlarda, Kuzey Amerika veya Kuzey Avrupa doğumlu olanlarda, daha önce meme, kolon ve endometriyum kanseri olanlarda ve ailesinde over kanseri olanlarda daha sık görülmektedir. Ailesinde hiç over kanseri olmayanlarda over kanseri riski yaşam boyu %1.4'dür. Birinci derece akrabaları over kanseri olanlarda risk %5'e, iki veya daha fazla akrabası hasta olanlarda risk %7 ye yükselmiştir (Kopuz ve diğ, 2000).

Over kanseri riskini artıran etmenler ileri yaş, genetik olarak yatkınlık, infertil olma ya da fertilite tedavisi görme, hormon replasman tedavisi (HRT) görme, fazla kilolu ve uzun olma, endometriyozis, pelvik enflamatuvar hastalığı, polikistik over sendromu, doğum kontrol haplarının daha az kullanımı, talk pudrası vb. olarak sıralanabilir (Montes ve diğ, 2012). Over kanserinde etkili olan risk faktörleri Tablo 2.4. gösterilmiştir.



**Tablo 2.7:** Epitelyal over kanserinin gelişmesiyle ilişkili risk faktörleri (Chu ve Rubin, 2006).

Risk Faktörü	Spesifik Risk Faktörü
Ailesel Yatkınlık	Kalıtıl meme ve over kanser sendromu
	BRCA1, BRCA2 mutasyon
	Lynch II sendromu (kalıtıl non-poliposis kolorektal kanser sendromu)
	DNA yanlış eşleşme tamir genleri mutasyonları
Yaş	>50 yaş
Demografi	Beyaz ya da Avrupa yahudi kökenlilik
	Endüstriyelmiş bölgelerde yaşamak (Japonya hariç)
Üreme faktörleri	Erken menarş, geç menapoz
	İnfertilite, daha önce hiç çocuk sahibi olmamak (emzirmek ve doğum kontrol hapları kullanmak koruyucudur)
	Hormon replasman tedavisi
	Endometriyozis
Beslenme	Fazla yağ ve kahve
	Düşük fiber ve vitamin A
Çevresel Maruz Kalma	Perineal talk pudrası kullanımı
	Asbestos
	Radyasyon
	Viral enfeksiyon (rubella, kabakulak)

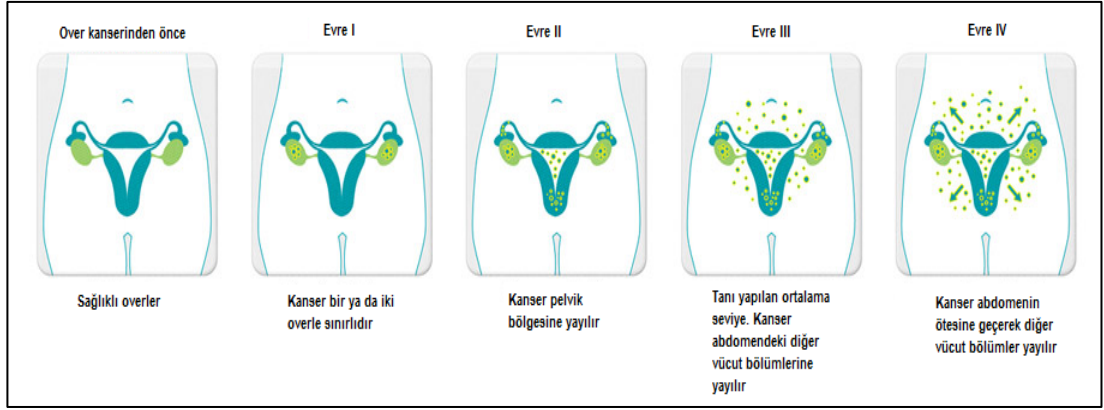
### 2.3. OVER KANSERİNDE SINIFLANDIRMA

Over kanserleri epitelyal ve non-epitelyal over kanserleri olarak 2 gruba ayrılır. Daha sık görülen epitelyal over tümörleri: seröz tümörler, müsinöz tümörler, endometrioid tümörler, berrak hücreli tümörler, Brenner tümörleri, indiferansiye karsinomlar, mikst epitelyal tümörler. Non-epitelyal ovaryum tümörleri: granüloza hücreli tümörler, germ hücreli tümörler, sarkomlar, lenfomalar (Berek, 2004) (Tablo 2.5.).

<b>Epitelyal over kanseri (%65)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Seröz Tümörler</li><li>• Müsinöz tümörler</li><li>• Endometrioid tümörler</li><li>• Berrak hücreli tümörler</li><li>• İndiferansiye karsinomlar</li><li>• Miks epitelyal tümörler</li></ul>
<b>Non-epitelyal over kanseri (%35)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Granülosa tümörler</li><li>• Germ hücreli tümörler</li><li>• Sarkomlar</li><li>• Lenfomalar</li></ul>

**Şekil 2.4:** Over kanserinin sınıflandırılması.

Over kanseri evrelemede FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics)'nin 1988'de önerdiği, 2006 ve 2014'de revize edilen evrelendirme sistemi kullanılmaktadır. FIGO sınıflaması, temelde I, II, III ve IV olmak üzere dört evreden oluşmaktadır. İlk üç evrenin A, B ve C tipleri de mevcuttur (Berek ve diğ, 2012). Tip I over kanseri, iyi ayırt edilebilen seröz, müsinöz, kötü huylu Brenner, berrak hücre ve endometrioid tümörlerini içermektedir. Tip I over kanseri yavaş ilerleme (progresyon) göstermektedir. Bu ilk tip kanserin oluşumu, mikrosatellit instabilitesi ve KRAS (V-K1-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog), BRAF (V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog),  $\beta$ -catenin, ve PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) de mutasyonlar içermektedir. Tip II over kanseri, erken evredeki hastalığın tespit edilebilmesi imkanını azaltan, erken metastaza sahip, kısmi ya da zayıf farklılaşma göstermiş olan seröz karsinomaları, farklılaşmamış karsinomaları, karsinomaları ve karışık mezodarmal kötü huylu tümörleri içerir. Bu ikinci grup patojenite sıklıkla p53 tümör supresör geninde mutasyonlar içermektedir (Kindelberger ve diğ, 2007). Tip III over kanseri bir ya da iki overden kaynaklandığı hücresel ve histolojik olarak doğrulanmış metastaz yapan tiptir. Tip IV over kanseri peritonal hariç diğer kanserlerden metastaz ile oluşmuş tiptir (FIGO 2014).



Şekil 2.5: Over kanserinin evreleri<sup>6</sup>.

## 2.4. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Over kanserinin tanısı spesifik olmayan semptomlar nedeniyle zordur (Roett ve Evans, 2009). En genel semptomları şişkinlik, pelvik ve abdominal ağrı, zor yeme ya da çabuk doyma, acil veya sık idrara çıkma isteğidir. Semptomatik veya asemptomatik over kanserlerinin tanısına yönelik birçok teknik vardır.

### 2.4.1. Pelvik Muayenesi

Son zamanlarda, pelvik muayenesi, transvajinal ultrasonografi ve CA-125 seviyesi over kanserinin tanısı için kullanılan standart yöntemlerdir. Fakat pelvik muayenesi erken tanı veya premalignant lezyonların normal overlerden ayırımının yapılmasında etkili bir yöntem değildir (Cragun, 2011). Bir pelvik kitlenin yalnızca pelvik muayene ile tanınmasının hassaslığı %40 ve özgüllüğü %90 olarak gösterilmiştir. Bu nedenle semptomlara ve pelvik muayeneye dayanarak over kanseri şüphesi duyulursa ileri testlere gidilir (Nguyen ve diğ, 2013, Myers ve diğ, 2006).

### 2.4.2. Tanısal Görüntüleme

*Ultrason* (ultrasonografi) ses dalgaları kullanılarak video ekranında görüntü elde edilmesidir. Detaylı görüntü elde edildiği için transvajinal ultrasonografi, over taramasında tercih edilen ilk tanı modelidir. Overde hacimce büyüme ve morfolojik anomalilerin tespitinde kullanılır. Endometriyozis ve fonksiyonel kistler gibi iyi huylu lezyonların insidansının postmenapozal kadınlarda az olması ve seri olarak yapılan

<sup>6</sup> <http://www.drjenniferashnton.com/>

görüntülemelerde tespit edilen belirli anomalilerin olması; ultrason ile yapılan testlerin yanlış pozitif sonuç oranını azaltır. Kabarcıklı görünüm yüksek oranda over kanseri ile özdeşleştirilirken, basit kistler ve septal kalınlaşmalar over kanseri ile çok az ilişkilidir (Granberg ve diğ, 1989; Lewis ve Menon, 2004). Ancak over kanseri tanısının kesin bir şekilde koyulabilmesi için transvajinal ultrasonografinin duyarlılığı ve özgüllüğü yeterli değildir (Fishman ve diğ, 2005). Bu görüntüleme tekniğinin yanlış pozitif sonuçlarını engelleme amacıyla 3D-ultrason, 3D-Doppler ve renkli Doppler olmak gibi ileri testler üretilmiştir. Böylece kötü huylu ve iyi huylu over lezyonları arasındaki ayrım yapılabilir (Cohen ve diğ, 2001, Kurjak ve diğ, 2000).

*CT* (computed tomography) taraması vücudu kesitler halinde detaylı olarak görüntüleyen x-ray prosedürüdür. X-ray'den farklı olarak tek bir görüntü yerine birden fazla görüntü alıp o görüntüleri birleştirir. *CT* ile küçük over tümörleri tespit edilemez. Büyük tümörleri, kanserin karaciğere ya da diğer organlara yayıldığını gösteren genişlemiş lenf nodülleri *CT* ile bulunabilir (American Cancer Society, 2011).

Over kanserinin tanısında kullanılan diğer görüntüleme yöntemleri *baryum enema X-ray*, *magnetik rezonans görüntüleme (MRI)*, *göğüs X-ray*, *pozitron emisyon tomografi (PET)*dir. Overlerde bulunun lezyonları tespit etmenin yanısıra dağılmış over kanseri tanısının yapılmasında da kullanılabilir (American Cancer Society, 2011).

### **2.4.3. Diğer Testler**

#### **2.4.3.1. Laparoskopi**

İnce ışıklı bir tüp yardımıyla overlere, pelvik organlarına ve bu alandaki diğer dokulara bakılarak bu dokuların analizinin yapıldığı bir yöntemdir. Abdomende açılan küçük bir kesikten abdomenin alt kısmına tüp yerleştirilir ve pelvis veya abdomenin görüntüleri monitöre gönderilir. Organ görüntülerinin elde edilmesiyle operasyonun veya diğer tedavi yöntemlerinin planlanması yapılabilir ayrıca kanserin hangi evrede olduğu belirlenebilir. Bunlara ek olarak laparoskopik kesiklerden küçük cihazlar yardımıyla biyopsi yapılabilir (American College of Obstetricians and Gynecologists., 2009)

#### **2.4.3.2. Kolonoskopi**

Bir kolonoskop ile (uzun, esnek, ucunda ışık ve kamera bulunan tüp) rektumdan kolona girilerek yapılan analiz yöntemidir. Monitöre gelen görüntülere göre biyopsi yapılabilecek herhangi bir anormal bölge tespit edilir. Bu yöntemin over kanserinde

kullanımı ise konstipasyon (kabızlık) gibi olası over kanseri semptomlarını araştırmak ve over kanseri kökenli yayılmaları analiz etmektir (American College of Obstetricians and Gynecologists., 2009)

#### **2.4.3.3. Biyopsi**

Büyüyen bir kitlenin kanser olup olmadığını belirlemenin en kesin yolu şüpheli bölgeden örnek alıp incelemektir ve bu yöntem biyopsi olarak tanımlanır. Over kanserinde biyopsi çoğunlukla tümörün çıkarılmasıyla yapılır. Nadir olarak da laparoskopi sırasında ya da abdomen derisinden direkt tümöre giden bir iğne ile şüpheli kitleden örnek alınır. İğne kullanılıyorsa genelde ultrason ve CT tarama yardımıyla kontrollü olarak gerçekleştirilir. Bu yöntem yalnızca ileri düzeyde kanser veya başka önemli sağlık durumu nedeniyle operasyon geçiremeyen hastalarda kullanılır çünkü biyopsi ile kanserin yayılma olasılığı göz önünde bulundurulur. İğneyi yönlendirmek için ultrason kullanılır. Alınan örnek laboratuvarında kanser hücresi içermesi bakımından incelenir (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2009)

#### **2.4.3.4. Kan testleri**

Over kanseri şüphesiyle yapılan kan testlerinde yüksek CA-125 seviyesi büyük oranda kanserli dokulardan kaynaklandığı bulunmuştur. İleri over kanseri hastalarının %80’den fazlasında, erken evre kanserlerinin ise %50’sinde CA-125 seviyesinin yükseldiği gösterilmiştir. “National Cancer Institute” genel populasyonda yüksek risk taşımayan kadınlara CA-125 testini uygulamayı uygun bulmamıştır çünkü CA-125 erken evre kanserlerinin yarısını tespit edemez ve tümörün iyi huylu olması durumunda da anlatımı artabilir. Diğer yandan, tedavinin etkisini görüntülemek ve tedavi sonrası nüks edenleri tespit etmek için CA-125 seviyesinin belirlenmesi “Food and Drug Administration (FDA)” tarafından onaylanmıştır<sup>7</sup>.

Bazı üreme hücre kanserleri “human chorionic gonadotropin (HCG)”, “alpha-fetoprotein (AFP)”, laktat dehidrogenaz (LDH) tümör belirteçlerinin kanda seviyelerinin artmasına neden olur. Over kanserinden şüpheleniliyorsa bu belirteçler kanda analiz edilebilir. Bazı over stromal tümörler kanda östrojen ve testosteron gibi

---

<sup>7</sup> <http://www.ocrf.org/about-ovarian-cancer/diagnosis-of-ovarian-cancer>. Ziyaret tarihi 25.04.2016.15:45.

inhibin ve hormonların kandaki seviyelerinin artmasına neden olur (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2009).

## 2.5. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER

Tümör biyobelirteçleri kanser hücresi ya da çevresindeki hücreler tarafından üretilen, kanserin tanısı, taraması veya tedavi sürecinde vücut sıvılarında ya da kanda ölçülebilen moleküllerdir. Tümör biyobelirteçleri olarak kullanılabilen moleküller sitoplazmik proteinler, enzimler, hormonlar, yüzey antijenleri, reseptörler, onkofetal antijenler (normalde doğumdan sonra kaybolan kanserde ise yeniden ortaya çıkan proteinler), onkogenler veya ürünleri olarak sayılabilmektedir. İdeal bir tümör biyobelirteci, belirlenen kanser tipine özgül olma özelliği taşıyarak küçük tümörlerin erken tanısı ve taraması için yeterli duyarlılığa da sahip olabilmelidir. Ancak ne yazık ki, günümüzde bu özellikleri taşıyan bilinen bir tümör biyobelirteci bulunmamaktadır (Burtis ve Ashwood, 2005].

İdeal bir tümör biyobelirtecinde bulunması gereken özellikler aşağıda verilmiştir (Sharma, 2009).

- Yüksek özgüllüğe sahip olmalıdır, sadece bir tümör tipine özgül olmalıdır.
- Yüksek duyarlılığa sahip olmalıdır, fizyolojik ya da iyi huylu tümör olması durumlarında saptanmamalıdır.
- Düzeyleri tümör özellikleri ve büyüklüğü ile orantılı olmalıdır.
- Tümör biyobelirteçlerinin prediktif ve prognostik yararı bilinmelidir.
- Yarı ömrü kısa olmalıdır, sık ve seri izlem yapılabilir.
- Ucuz olmalı ve kolay uygulanabilmelidir.
- Tarama testi olarak kullanılabilmelidir.
- Örnek alımı kolay olmalıdır.

Over kanserinde kullanılan potansiyel biyobelirteçler tiplerine göre Tablo 2.5.'de gruplandırılmıştır.

**Tablo 2.8:** Over kanserinde kullanılan potansiyel biyobelirteçler (Zhang ve diğ, 2011).

Belirtecin tipi	Strateji veya teknoloji	Belirteç	
<b>Gen temelli over kanser biyobelirteçleri</b>	Kalıtısal gen mutasyonları	Mutasyonlar	BRCA1 ve BRCA2, hMLH1 ve hMSH2
	Epigenetik değişimler	Hipermetilasyon	BRCA1, RASSF1A, APC, p14ARF, p16INK4a, DAPKinase
	Gen anlatımı	Mikroarray teknolojisi	Gen anlatım profillemesi
SAGE teknolojisi		CLDN3, HE4, FOLR1, COL18A1, CCND1, FLJ12988	
<b>Protein temelli over kanser biyobelirteçleri</b>	Proteomik teknolojileri (Mass spektrometri)	Proteomik patern analizi	
		“Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4”, transferrin, afamin gibi tek, yeni biyobelirteçlerin bulunması	
<b>Metabolit temelli over kanser biyobelirteçleri</b>	NMR spektroskopisi	Metabolomik profil	
	Kütle spektroskopisi	Metabolik profillemesi	
<b>MikroRNA temelli over kanser biyobelirteçleri</b>	Mikroarray	miRNA anlatım profilleri; anlatımı artmış miRNA, (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-21, miR-203, miR-205, miR-214; Anlatımı azalan miRNAs, (miR-199a, miR-140, miR-145, miR-125b1 vb)	
		Real-time PCR	Anlatımı artmış miRNA, (miR-21, miR-92, miR-93, miR-126, miR-29a; anlatımı azalmış miRNA, (miR-155, miR-127, miR-99b vb.)

### 2.5.1. Protein Temelli Over Kanseri Belirteçleri

Proteomik, biyolojik işlemlerin anlaşılmasında kullanılan en güçlü teknolojidir ve temel amaçlarından biri hastalıklar için vücut sıvılarında ya da dokularda biyobelirteç bulmaktır (Zhang ve diğ, 2011; Zhang ve diğ, 2010). Gen temelli biyobelirteçler over

kanseri için potansiyel olarak bilinse de hala klinikte uygulanacak kanser spesifik biyobelirteç yoktur çünkü genin anlatım seviyesi ile protein seviyeleri bağlantılı değildir. Over kanseri tanısında proteomik uygulamalar iki yolla yapılır. İlki “serum protein profilleme” veya “proteomik patern tanı” olarak adlandırılır ve kanserli olanla olmayan örneklerin proteomik yapılarının kütle spektrometrik farklarına dayanır (Plebani, 2005). Yapılan çalışmalara göre over kanserinde proteomik patern analizi erken evrede tanı için özgün ve çok hassas bir yöntemdir (Petricoin ve diğ, 2002).

Over kanseri biyobelirteçlerinin bulunması için ikinci alternatif proteomik yöntem ise; tek ve belirli bir biyobelirtecin belirlenmesi ardından yeni analizler geliştirilmesidir (Plebani ve diğ, 2005). Son yıllarda over kanseri tanısı için proteomik çalışmalarla elde edilmiş birçok biyobelirteç vardır (Zhang ve diğ, 2004; Ahmed ve diğ, 2005; Dieplinger ve diğ, 2009). “Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4” gibi proteomik analizle elde edilen biyobelirteçler normal serum proteinleridir, proteazlar tarafından translasyon sonrası üretilir ve belirli kanser türlerini gösterir (Zhang ve diğ, 2004). Transferrin gibi diğer biyobelirteçler akut faz proteinleridir ve kanser olmayan diğer koşullarda olduğu gibi sistematik inflamasyon ile ilişkilidir (Ahmed ve diğ, 2005). Bunlara benzer proteinler CA-125 ile beraber kullanılarak kanser tanısında önem kazanmışlardır (Dieplinger ve diğ, 2009). Bunların hepsi kanser spesifik belirteçler değildir ve direkt olarak over kanserinden kökenlenmezler. Bu nedenle proteomik bazlı biyobelirteçlerin önemi ve over kanserine spesifiteleri hala araştırılması gereken alanlardır (Zhang ve diğ, 2011). Tablo 2.6.’de over kanser için kullanılan tümör belirteçleri gösterilmiştir (Jacobs ve Menon, 2004; Bast Jr., 2003; Chu ve Rubin,2005).



**Tablo 2.9:** Over kanseri için tümör belirteçleri (Jacobs ve Menon, 2004; Bast Jr., 2003; Chu ve Rubin,2005).

Alpha-1-antitrypsin	HE4	“Mesothelin”
BHCG	IL-2 reseptör	“Mucin-like carinoma antigen”
CA15-3	IL-6	“Sialyl TN”
CA19-9	IL-8	“Soluble Fas ligand”
CA50	IL-10	“Tetranectin”
CA54-61	Inhibin	“Tumor-associated trypsin inhibitör”
CA72-4	HER-2/neu	“Osteopontin”
CA125	“Human milk fat globule protein”	“Ovarian serum antigen”
CA195	“Human milk globule 2”	OVX1
“Cathepsin L”	Kallekrein-6	“p110 epidermal growth factor receptor”
“Carcinoembryonic antigen”	Kallekrein-10	“Placental alkaline phosphatase”
“Ceruloplasmin”	“Klipid-associated sialic acid”	“Prostasin”
CRP	“Lysophosphatidic acid”	“Tumor necrosis factor receptor”
CYFRA21-1	“Matrix metaloproteinase 2”	“Urinary gonadotropin peptide”
“Dianon marker 70/K”	MCSF	“Galactosyltransferase”

Bugüne kadar, CA-125 glikoprotein antijen epitelyal over tümörleri için en çok kullanılan tümör belirteçidir. CA-125 ilk olarak OC125 mürin monoklonal antikoru kullanılarak saptanmıştır (Bast ve diğ, 1983). CA-125, hastalık teşhisi amacıyla kullanılan bir tarama testi değildir, daha çok hastalık tanısı konulan kişilerde görüntüleme yapmak amacı ile kullanılmaktadır. CA-125 değeri erken evredeki over kanserli kadınların %47'sinde, ileri evredeki over kanserli kadınların %80-90'ında yüksek olarak tespit edilmiştir (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2009). CA-125 seviyesi iyi huylu tümör bulunduran premenapozal kadınlarda da postmenapozal durumlu kadınlarda da yüksek bulunmuştur fakat bu testin postmenapozal durumlu kadınlarda daha etkili olduğu düşünülmektedir (Rossing ve diğ, 2010). Daha etkili olduğunun düşünülmesinin nedeni olarak da postmenapozal durumlu kadınlarda yapılan denemelerin daha az yanlış pozitif sonuç vermesi gösterilmektedir (Skates ve diğ, 2011). Klinik olarak hastalığın seyri, izlenmesi ve korumanın en iyi şekilde yapılabilmesi için over kanseri olan kadınlarda CA-125 değerleri takip edilmiştir. CA-125 en eski ve en iyi performans gösteren biyobelirteç olmasına rağmen CA-125 tek başına kullanılmayacaktır. Ovaryum kanserini erken evrede saptamak amacıyla CA-125 içerecek bir biyobelirteç paneli kullanılacaktır (Drapkin ve diğ, 2005). CA-125 kullanımıyla diğer biyobelirteçlerin görüntüleme teknikleri ile birlikte ya da

ayrı ayrı kullanımını kapsayan çalışmalara ve gerekli ölçüde özgüllük ve duyarlılık gösterebilen çoklu belirteçlerin kullanımına odaklanılmıştır (Obeidat ve diğ, 2004).

### **2.5.2. Gen Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri**

Kanserin genetik değişikliklerden, çevresel faktörlerden ve çevre ile genetik faktörlerin birleşiminden oluştuğu düşünülmektedir. Bölünme, programlanmış hücre ölümü ve yaşlanmanın düzenlenmesinde etkili olan genetik değişiklikler normal over kaynaklı epitelyal hücrelerin kötü huylu tümörlere dönüşmesine neden olur. Over tümörlerinin büyük çoğunluğu genetik hasarların birikimi nedeniyle ortaya çıkar fakat epitelyal, sınırdan olan ve kötü huylu tümörlerin gelişiminde etkili olan spesifik genetik yollar büyük ölçüde bilinmemektedir. Genetik değişimlerle over tümörleri arasındaki önemli ilişki göz önünde bulundurulduğunda gen düzeyinde (kalıtsal gen mutasyonları, epigenetik değişimler ve gene anlatımı üzerine) yapılan çalışmalarla potansiyel over kanser biyobelirteçleri bulunabilir (Tablo 2.7.). Kanserde genetik değişiklikleri tespit etmek için kullanılan DNA ve RNA temelli kanser biyobelirteçlerinin tespitinde mikroarrayler, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), DNA ve RNA dizileme, floresan in-situ hibridizasyon (FISH) vb. teknikler kullanılır (Zhang ve diğ, 2011).

**Tablo 2.10:** Epitelyal over kanserinde gen değişimleri <sup>8</sup>.

Değişim	Etki	Kromozom	Gen
Gen amplifikasyonu	Aktivasyon	1q22	<i>RAB25</i>
		3q26	<i>PRKCI, EVI1</i> and <i>PIK3CA</i>
		5q31	<i>FGF1</i>
		8q24	<i>MYC</i>
		19q	<i>PIK3R1</i> and <i>AKT2</i>
		20p	Belirlenmemiş
		20q13.2	<i>AURKA</i>
Gen delesyonu	İnaktivasyon	4q, 5q, 16q, 17p, 17q, Xp, Xq	Belirlenmemiş
Mutasyon	Aktivasyon	Uygun değil	<i>KRAS</i> (15%), <i>BRAF</i> (12%), <i>CTNNB1</i> (12%), <i>CDKN2A</i> (10%), <i>APC</i> (9%), <i>PIK3CA</i> (8%), <i>KIT</i> (7%), <i>SMAD4</i> (7%)
Hipometilasyon	Aktivasyon	Uygun değil	<i>IGF2, SAT2</i>
Heterozigositenin kaybolması	İnaktivasyon	17p13, 17q21 (vakaların %50'si ve fazlası)	<i>ARHI, PEG3, PLAGL1, RPS6KA2, TP53, BRCA1, BRCA2</i>
		1p, 3p, 5q, 5q, 6q, 7q, 8q (vakaların %30'undan az)	<i>PTEN, OPCML, WWOX</i>
Mutasyon	İnaktivasyon	Uygun değil	<i>TP53</i> (62%), <i>BRCA1</i> (5%), <i>BRCA2</i> (<5%), <i>PTEN</i> (3–8%)
Promotör metilasyonu	İnaktivasyon	Uygun değil	<i>ARHI, DAPK1, CDH13, MLH1, ICAM1, PLAGL1, DNAJC15, MUC2, OPCML, PCSK6, PEF3, CDKN2A, CDKN1A, RASSF1, SOCS1, SOCS2, PYCARD, SFN</i>

### 2.5.2.1. Kalıtsal Gen Mutasyonları

Epitelyal over kanserlerinin en az %10'u kalıtsaldır ve vakaların yaklaşık %90'ında meme kanseri 1-2 (*BRCA1* ve *BRCA2*) tümör baskılayıcı genlerde “germ line” mutasyonlarla karşılaşmıştır. Geriye kalan %10 vakada ise DNA yanlış eşleşme tamir (MMR) genlerinde, özellikle “Lynch sendromu”na yatkınlık genleri olan *hMLH1* ve

<sup>8</sup> APC; adenomatous polyposis coli; AURKA, aurora kinase A; CDH13, cadherin 13; CDKN, cyclin-dependent kinase inhibitor; CTNNB1;  $\beta$ -catenin 1; DAPK1, death-associated protein kinase 1; EVI1, ecotropic viral integration site 1; FGF1, fibroblast growth factor 1; ICAM1, intracellular adhesion molecule 1; IGF2, insulin-like growth factor 2; MUC2, mucin 2; OPCML, opioid-binding protein/cell adhesion molecule-like; PCSK6, proprotein convertase subtilisin/kexin type 6; PEG3, paternally expressed 3; PIK3CA, PI3K catalytic subunit- $\alpha$ ; PIK3R1, PI3K regulatory subunit 1; PRKCI, protein kinase C $\gamma$ ; PLAGL1, pleiomorphic adenoma gene-like 1; RPS6KA2, ribosomal protein S6 kinase 2; SAT2, spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2; SFN; stratifin; SOCS, suppressor of cytokine signalling.

hMSH2’da meydana gelen “germ line” mutasyonlar görülmüştür (Russo ve diğ, 2009; Prat ve diğ, 2005). Her iki BRCA proteininin de DNA hasarının belirli formlarının özellikle çift zincir kırıklarının tanınmasında olduğu kadar gen anlatımın transkripsiyonel düzenlenmesinde de etkili olduğu gösterilmiştir. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonları genel olarak çerçeve kayması veya “nonsens” farklılıktır (Prat ve diğ, 2005). hHSH1 ve hHSH2 genleri en önemli DNA tamir mekanizmalarında görevlidirler ve DNA replikasyonu sırasında yanlış nükleotid eşleşmelerinin tamirinden sorumludurlar. Bu MMR genlerindeki mutasyonlar DNA replikasyonunda normal olarak ortaya çıkan hataların hücresel olarak tamirinde değişikliklere neden olurlar (Russo ve diğ, 2009). Günümüzde, yukarıda belirtilen gen mutasyonları için genetik testler ile over kanseri gelişiminde yüksek risk taşıyan hastalar belirlenebilir ve over kanseri riskini büyük ölçüde düşürmek için klinik müdahaleler önerilebilir (Zhang ve diğ, 2011).

#### **2.5.2.2. Epigenetik Değişimler**

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu gen regülasyonunda, tümör oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rol oynayan epigenetik mekanizmalardır. Promoter bölgesindeki spesifik genlerde metilasyon oranının ölçülmesi kanserin erken tanısında, hastalığın ilerlemesinin tespitinde ve terapiye verecek cevabın tahmininde yardımcı olur. Epigenetik düzenlemelerle değişen spesifik genlerin belirlenmesi over kanserinde aktif olarak çalışılan araştırmalardan biridir. Örneğin, over veya primer peritonel tümörlü 50 hastadan elde edilen tümör DNA’sında 6 tümör baskılayıcı gen promotörden (BRCA1, RASSF1A, APC, p14ARF, p16INK4a, DAPKinase)<sup>9</sup> oluşan panelden en az birinin tümör spesifik hipermetilasyonuna rastlanmıştır. 50 hastanın 41’inde (%82 sensitivite) benzer gen mutasyonu paterni gözlenmiştir. Bu verilerin aksine 40 kontrol vakasından toplanan tümör yapısı göstermeyen doku ve serumlarda hipermetilasyona rastlanmamıştır (%100 spesivite) (Ibanez de Caceres ve diğ, 2004; Zhang ve diğ, 2011). Bugüne kadar yapılan çoğu çalışma hipermetilasyonlanmış aday genler ve sessizleşmiş aday tümör baskılayıcı genler üzerine odaklanmıştır. Son zamanlarda over kanserindeki hipometilasyonlanmış spesifik bölgeler üzerinde gittikçe artan ilgi vardır. Kanda dolaşan DNA’da epigenetik belirteçlerin araştırılabilir olması non-invasiv testlerin gelişmesini sağlamıştır (Ibanez de Caceres ve diğ, 2004; Zhang ve diğ, 2011).

<sup>9</sup> RASSF1A, RAS association domain family protein 1A; APC, Adenomatous polyposis coli; DAPKinase, Death associated protein-kinase

### 2.5.2.3. Gen Anlatımı

Serum veya tümör dokusundaki kantitatif ya da yarı-kantitatif olarak spesifik genlerin anlatım analizleri tümör tanısına potansiyel katkı sağlarlar. Son on yılda, mikroarray teknolojisinde gelişmelere bağlı olarak gen anlatımı analizleri artan bir ivme kazanmıştır çünkü mikroarray teknolojisi ile belirli bir doku parçasında onlarca veya yüzlerce genin anlatım analizi tek seferde yapılabilir. “High-throughput” metot olarak bilinen mikroarrayden elde edilen veriler güçlü veri analiz yöntemleriyle değerlendirildiğinde, normal ve kanserleşmiş hücrelerde genlerin anlatımını karşılaştırılabilir ve kanser gelişmesinde anlatım farklılığı olan genler tespit edilebilir. Mikroarray verileriyle transkripsiyonel profillerine tümör sınıflandırılması da yapılabilir böylece önemli biyolojik, tanısal ve prognostik veriler elde edilir. Gen anlatım profilleme üç ana başlıkta odaklanmıştır: normal over dokusuyla tümörlü dokunun ayrılması, over kanserinin farklı subtiplerinin belirlenmesi, tedaviye verdiği olması muhtemel cevaplara göre kanserin belirlenmesi. Epitelyal over kanserinde gen anlatım profilleme prognostik veri elde etmek, başlangıç platinium temelli kemoterapiye verdiği cevabı tahmin etmek, farklı histolojik subtiplerin arasındaki ayrım yapabilmek amaçlı kullanılır (Konstantinopoulos ve diğ, 2008). Mikroarray teknolojisine ek olarak, gen anlatımının seri analizi (“serial analysis of gene expression”-SAGE) over kanserinde gen anlatımının kantitatif analizinin yapılmasında kullanılan diğer önemli teknolojidir. SAGE mRNA transkriptlerinin ölçümünü kolaylaştırır. Ayrıca normal ve patolojik dokuların spesifik olmayan (“non-biased”) gen anlatım profillemesini yapar böylece yeni transkriptlerin anlatım analizini yapılırken daha önceden karakterize edilmemiş genler tespit edilebilir. Bu yönüyle geleneksel mikroarray tekniğine dayalı anlatım analizine göre oldukça avantajlıdır. Over kanserinde anlatımları değişmiş yeni ve bilinen çoğu gen (CLDN3, HE4, FOL1, COL18A1, CCND1, FL gibi)<sup>10</sup> SAGE yöntemiyle bulunmuştur (Peters ve diğ, 2005; Zhang ve diğ, 2011).

### 2.5.3. Metabolit Temelli Over Kanser Biyobelirteçleri

Metabolomik sistem biyolojide bir omik bilimdir ve biyolojik sistemdeki endojen metabolitlerin global kantitatif değerlendirme yöntemidir. Metabolitler sistem genomuyla çevresinin etkileşimi sonucunda oluşur ve yalnızca gen anlatımının son ürünü değil düzenleyici sistemin de bir parçasıdır. Hem kişisel hem de gruplarda

<sup>10</sup> CLDN3, claudin 3; WFDC2(HE4), WAP four-disulfide core domain 2; FOLR1, folate reseptör 1; COL18A1, collagen type XVIII a1; CCND1, cyclin D1

metabolitlerin tespiti hücrede, dokuda veya biyoakışkan materyaller üzerinde nuklear manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi veya MS (mass spectorscopy-kütle spektroskopisi) ile yapılır. Metabolik belirteçlerin non-invasiv olarak in vivo ayrımını yapabilen metabolik ve moleküler görüntüleme teknolojilerinin gelişmesiyle metabolomik; laboratuvar ile klinik arasındaki bağlantıyı sağlayabilir duruma gelmiştir. Metabolomun onkolojide de erken tespit ve tanı, ilaç tedavisine cevabı görüntüleme ve ilaç toksisitesi gibi birçok kullanım alanı vardır (Spratlin ve diğ, 2009; Zhang ve diğ, 2011). Over kanseri tanısında, operasyon olmamış 38 EOK, 12 iyi huylu over kisti hastasından ve 51 sağlıklı kişiden alınan serumlarda <sup>1</sup>H NMR spektroskopisi kullanılmıştır. Sonuçlara göre orijinden 2.77 ve 2.04 ppm (parts per million) uzaklıktaki <sup>1</sup>H NMR bölgesi %100 sensitivite ve spesivite ile tespit edilmiştir. Bu bulgular; normal ile EOK serumlarının arasındaki ayrımın <sup>1</sup>H NMR metabolomik analiz kullanılarak tamamiyle yapabildiğini gösterir. EOK'nin erken tanısında kullanılacak potansiyel bir yöntem olarak daha da geliştirilmesi gerektiği anlaşılmıştır (Odunsi ve diğ, 2005). Bir başka çalışmada ise gaz kromatografisi/"time-of-flight kütle spektrometrisi" (GC-TOF MS) kullanılarak 66 invasiv over kanser ve 9 sınırdaki tümörden toplanan "fresh frozen" tümör dokusunda metabolit analizi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda sınırdaki tümörlerle karsinomalar arasında 51 metabolit açısından önemli ölçüde değişiklik olduğu gösterilmiştir. Böylece over tümörlerinin primer metabolizmasında tutarlı ve önemli değişimler olduğu ve bu değişimlerin büyük ölçekli metabolik profillemeye ile tespit edilebileceği belirtilmiştir (Denkert ve diğ, 2006).

Sınırlı sayıda elde edilen verilere göre; metabolomik over kanseri tanısında potansiyel faydası olduğu gösterilmiştir; fakat metabolomik hala çok yeni alandır ve geliştirilmesi gerekir. Metabolomik alanındaki ileri gelişmelerin kanser araştırmalarına odaklanması kötü huylu tümörlerdeki tüm moleküler analizinin yapılması açısından oldukça önemlidir (Zhang ve diğ, 2011).

#### **2.5.4. MikroRNA Temelli Over Kanser Biyobelirteçleri**

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kodlama yapmayan RNA genlerinden anlatım yapan fakat protein kodlamayan RNA'lardır. Translasyonun baskılanmasını veya mRNA'nın yıkımını, diziye özel gen düzenlenmesini sağlar böylece gelişme, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenler (Zhang ve diğ, 2011).

İlk mikroRNA (*lin-4*) 1993'de *Caenorhabditis elegans*'ta hücrel gelişimin araştırmaları sırasında keşfedilmiştir (Almeida ve diğ, 2011). *C. elegans*'taki gelişimsel süreçte zamanlamayı kontrol eden heterokronik genlerden *lin-4*'ün *lin-14*'ü baskıladığı belirlenmiştir (Ambros, 1989; Lee ve diğ, 1993). Ambros ve diğ. *lin-4* geninin 22 nükleotidlik kodlanmayan bir dizi olduğunu, bu genin klonlanması esnasında keşfetmişlerdir (Lee ve diğ, 1993). Daha sonra *lin-14* geninin 3'-UTR (Untranslated region: translasyon olmayan bölge) bölgesinde korunmuş dizilerin bulunduğu ve bu dizilerin *lin-4* dizisine komplementer olduğu bildirilmiştir (Wightman ve diğ, 1991). Bunun yanı sıra *lin-4*'ün, *lin-28*'i de regüle ettiği Ambros ve ark. tarafından gösterilmiştir (Moss ve diğ, 1997). Keşfedilen ikinci miRNA olan *let-7* yine *C.elegans*'ta heterogenik gen ürünü olarak 21 nükleotidlik kodlama yapmayan RNA'dır ve larva gelişmesini kontrol eden genleri düzenlediği bulunmuştur (Reinhart ve diğ, 2000).

İnsan genlerinin yaklaşık %3'ü miRNA kodlarken protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'u miRNA'lar tarafından düzenlenir. Bu miRNA'lar her hücre tipine, hücrenin gelişme ve farklılaşma evresine göre değişir. Yapılan çalışmalara göre farklı anlatım yapan ya da mutasyonlu miRNA'ların; hedef genine göre değişen yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak kanser gelişimde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Iorio ve diğ, 2007).

#### 2.5.4.1. miRNA Biyogenezi

MikroRNA'ların biyosentezi (şekil 2.6.) birbirini izleyen 3 basamaktan oluşur; miRNA genlerinden primer miRNA (**pri-miRNA**)'ların transkripsiyonu, pri-miRNA'ların nükleus içinde prekürsör miRNA (**pre-miRNA**)'lara dönüştürülmesi ve sitoplazma içinde **olgun miRNA**'ların oluşumu (Günel ve diğ, 2014).

Nükleer genomda kodlanan miRNA genlerinden *RNA polimeraz II* enzimi tarafından primer mikroRNA (pri-miRNA) sentezlenmektedir (Lee ve diğ, 2004). Sentezlenen pri-miRNA 3-4 kilobaz boyutunda ve 5' şapka ile poli(A) içeren karmaşık bir sekonder sarmal yapıdadır (Lee ve diğ, 2004; Saini ve diğ, 2007).

Pri-miRNA nükleusta, *RNAaz III* enzim ailesinin bir endonükleazı olan *Drosha* ve kofaktörü *DGCR8*'in (sineklerde *Pasha*) oluşturduğu mikro işlemci kompleks ("microprocessor complex") tarafından yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda olan

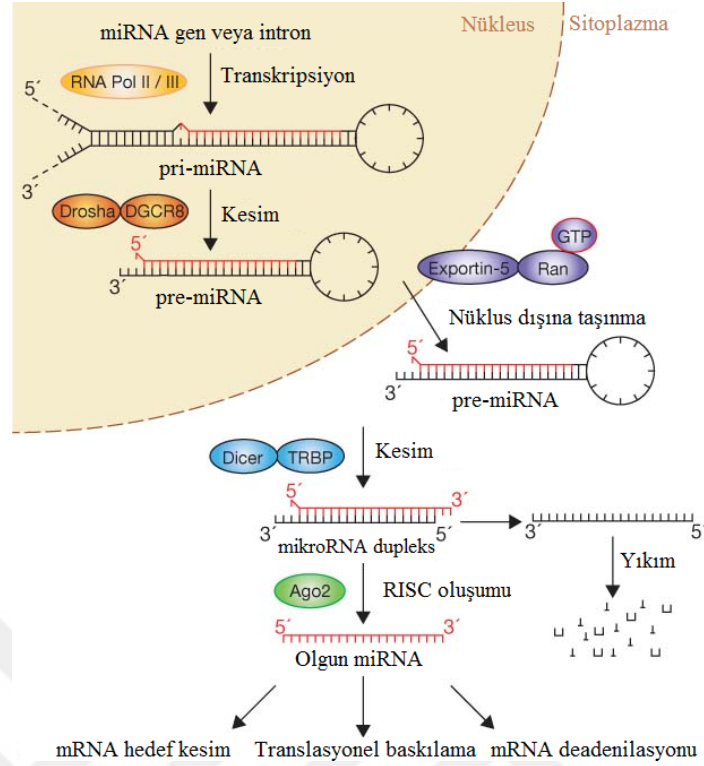
pre-miRNA'ya dönüştürülür (Saini ve diğ, 2007; Zeng ve diğ, 2005; (Gunel ve diğ, 2014). Pri-miRNA'nın mikroşlemci kompleksi tarafından kesilimi sırasında, katalitik işlem gören DGCR8 tek ve çift iplikli RNA molekülünü tanır. Drosha çift iplikli saç tokası yapıdaki molekülü keser ve 5' ucundan monofosfat, 3' ucunda 2 nükleotid hidroksil uzantısı bulunan pre-miRNA'yı oluşturur (Han ve diğ, 2006). Pre-miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan *Exportin 5* (Exp-5) ve nükleer bir protein olan *RAN-GTP*'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (Almeida, 2011). Exp-5'in pre-miRNA'ları taşıma görevinin yanında bağlandığı pre-miRNA'yı yıkımdan koruyucu etki gösterdiği öne sürülmüştür (Hutvágner ve diğ, 2001).

Sitoplazmada bulunan pre-miRNA'lar bir RNaz III enzimi olan "Dicer-1" ve onunla beraber iş gören TRBP/PACT<sup>11</sup> proteinleriyle kısa çift zincirli miRNA dublekslerine dönüşür. Ardından bu dupleks bir helikazla yaklaşık 20 nükleotidlik olgun tek zincirli miRNA'lara dönüşür. Çift zincirden biri kılavuz zincir diğeri ise yolcu (komplementer) zincir olarak adlandırılır (Khvorova ve diğ, 2003). Oluşan miRNA'lar (kılavuz zincir) argonat ailesi proteinlerinden oluşan *RISC* (*RNA-induced silencing complex*) çok bileşenli kompleksiyle birleşir (Siomi H. ve Siomi M.C., 2010). Yolcu iplik RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. MikroRNA'lar, *RISC* kompleksine entegre olduktan sonra, ya *argonat* proteinleri yardımıyla mRNA'nin yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olur (Gunel ve diğ, 2014).

---

<sup>11</sup> Human immunodeficiency virus transactivating response RNAbinding protein (TRBP)/Protein Kinase R-activating protein (PACT)





Şekil 2.6: miRNA biyogenezi (Winter ve diğ, 2009).

#### 2.5.4.2. Over Kanseri Tanısında miRNA'ların Rolü

Kanser genomda birçok değişimin olmasıyla oluşan bir hastalıktır. Kodlama yapmayan fonksiyonel dizilerdeki değişimler hakkında çok az bilgiye sahipken kanser genom çalışmaları çoğunlukla protein kodlayan genler üzerine odaklanmıştır (Calin ve Croce, 2006; Esquela-Kerscher ve Slack, 2006; Zhang ve diğ, 2008). miRNA'lar hedef genine göre değişen yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak kanser gelişimde önemli rol oynar (Iorio ve diğ, 2007). miRNA'ların kanserin ilerlemesinde etkili bu patojenik özellikleri yakın gelecekte yeni kanser biyobelirteçlerinin ve/veya yeni terapötik hedeflerin geliştirilmesinde etkili olacaktır. "High-throughput" miRNA teknolojileri miRNA profillemede kullanılan güçlü araçlardır ve son zamanlarda mikroarray tekniği ile farklı onkotiplerde miRNA anlatım profilleri analiz edilebilmiştir (Zhang ve diğ, 2008, Zhang ve diğ, 2011). miRNA anlatım profilleri dokuların gelişimsel orijinleriyle paraleldir, kanser tanı ve sınıflandırılmasında biyobelirteç olarak potansiyeli mRNA'dan daha fazladır (Lu ve diğ, 2005). miRNA'ların yarıdan fazlası genomik olarak kırılğan ve kanserle ilişkili bölgelere sıralanmıştır ayrıca miRNA genlerinin anomalileri kopyalarak kansere etkisi olduğu kanıtlanmıştır (He ve diğ, 2005; Calin ve diğ, 2002; Zhang ve diğ, 2006; Zhang ve diğ, 2008).

Farklı kanser türlerinde moleküler defektleri saptama amacıyla *Kanser Genom Atlas Projesi* oluşturulmuş ve birçok çalışma projeye dahil edilmiştir (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011). Son yıllarda EOK'de miRNA anlatım profili hakkında birçok çalışma yapılmış ve normallere göre oldukça fazla düşüş olduğu görülmüştür (Iorio ve diğ, 2007). Iorio MV ve diğ.(2007) yaptığı çalışmada tasarlanmış (“custom”) microarray kullanılarak 59 EOC operasyon örneği ile 15 normal over karşılaştırılmış ve 29 farklı anlatım yapmış miRNA'ya rastlanmış, bazıları Tablo 2.5.'de gösterilmiştir. Ayrıca, over kanserinde belirlenen miRNA'lar bu tümörleri histolojik subtiplerine ve kanserleşme seviyelerine göre ayrılabilir (Iorio ve diğ, 2007).

Ökaryot hücrelerinde, miRNA biyogenezi aşamalarında (transkripsiyon, pri-miRNA kırılması, pre-miRNA taşınması ve pre-miRNA kırılması) çeşitli düzenlemeler bulunmaktadır (Lee ve Dutta, 2009; Ozsolak ve diğ, 2008). miRNA anlatım seviyelerinin normallere göre over kanserinde değişiklik göstermesi epigenetik değişimler, genetik değişiklikler (kopya sayı değişimleri gibi) ya da transkripsiyonel faktörlerin farklılaşmış anlatımları ile gerçekleşir ve miRNA genlerini hedeflemektedir. Kanser hücrelerinde transkripsiyonel gen susturması sıklıkla epigenetik defektlerle ilişkili olmaktadır (Soto-Reyes ve diğ, 2012; Zhang ve diğ, 2008). Yapılan çalışmalara göre miRNA biyogenezinde etkili olan anahtar proteinlerde disfonksiyon veya düzensizlik meydana gelmiş olabileceği ve tümör oluşumuna neden olabileceği ileri sürülmüştür (Zhang ve diğ, 2008).

MiRNA'ları potansiyel birer biyobelirteç yapan bir diğer özellikleri serum ve plazmada korunmuş halde bulunma durumlarıdır. Bu sayede miRNA anlatım analizleri direkt olarak serumdan yapılabilir. EOK hastalarında; dolaşan tümör eksozomlarından elde edilen miRNA anlatım profili iyi huylu tümörle ve normal bireylerle karşılaştırılmış ve farklı anlatım profilleriyle birbirinden ayrılmıştır. Bu çalışmada eksozomlar manyetik boncuklarla ve antiEpCAM antikolarıyla ayrılmış, miRNA'lar izole edilmiş mikroarray ile analiz edilmiştir. Sonucunda farklı anlatım yapan miRNA'lara rastlanmıştır (Tablo 2.5.)(Taylor ve Gercel-Taylor, 2008).

Resnick ve diğ. (2009) yaptığı çalışmada over kanseri hastalarından ve normal bireylerden toplanan serumlarda “Real-time PCR” ile miRNA anlatım analizi yapılmıştır ve anlatım farklılığı gösteren miRNA'lar bulunmuştur (Tablo 2.5.). Bu

miRNA'lerden anlatımı artan olan 3 miRNA'nın (miR-21, miR-92, miR-93) elde edildiği hastaların normal CA-125 seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna dayanarak miRNA analizlerinin kullanılan tanı yöntemlerine tamamlayıcı özellik taşıdığı söylenebilir (Resnick ve diğ, 2009).

Yapılan tüm çalışmalara dayanarak miRNA'ların spesifik genlerin anlatımını düzenleme özelliğinden dolayı hem normal hem de patolojik over vakalarında çok önemli rol oynadığı açıkça gösterilmiştir. Bununla birlikte miRNA'ların EOK'de tanı, yayılma ve tedaviye yanıtı tahmin etme gibi alanlarla ilişkili olduğu konusunda fikir birliğine ulaşılmamıştır. Bu nedenle over kanserinde miRNA'ların rolü hakkında daha çok bilgi edinilmeli ve bu sayede kanserleşmeye karşı müdahalelerin gelişmesine izin verilmelidir (Zhang ve diğ, 2011). Over kanserinin heterojenik bir hastalık olmasından dolayı tedavi ve tanı seçenekleri bireyden bireye değişebilir, bu bağlamda miRNA'ların doku ve orijine spesifik özelliğinden yararlanılabilir ve kişiye özel tedavi yöntemleri uygulanabilir (Hausler ve diğ, 2010).

### **2.5.5. Over Kanseri Biyobelirteç Panelleri**

Over kanserinin kompleks ve heterojen yapısı nedeniyle tek bir biyobelirteçle tüm subtiplerinin ve evrelerinin yüksek hassasiyet ve özgünlükle tespit edilmesi mümkün değildir. Çoğu araştırmaya göre over kanserinde birlikte kullanılan birçok biyobelirteç CA-125 hassasiyetini önemli derecede arttırmıştır (Yurkovetsky ve diğ, 2006). Belirteçlerin beraber kullanılmasıyla elde edilen yüksek hassasiyet; özgünlüğün önemli derecede düşmesiyle ilişkilidir (Bast, 2004). Uygun hassasiyet ve özgünlükteki bazı biyobelirteç panelleri over kanserinin tespit edilmesinde çok büyük potansiyele sahiptir (Gagnon ve Ye, 2008). Örneğin, 6 biyobelirteçten<sup>12</sup> oluşan yeni bir panel 362 sağlıklı birey ve 156 over kanseri tanısı yeni koyulmuş (13 tane evre I) hastada çalışılmış ve sonucunda %95.3 hassasiyet, %99.4 özgünlük elde edilmiştir (Kim ve diğ, 2009) fakat bu çalışmada deney dizaynı ve istatistik analizler hakkında tartışmalar vardır. Biyobelirteç panellerinin en çarpıcı hassasiyet ve özgünlük oranları bağımsız validasyon çalışmaları yapılmayan ve daha az sayıda örnekle (özellikle birkaç evre I hastasıyla) çalışılan araştırmalardan elde edilmiştir. Bu nedenle biyobelirteç testlerinin kliniğe aktarılmasından önce, geçmişe ve geleceğe yönelik klinik denemeler gibi birçok

---

<sup>12</sup> Leptin, prolaktin, osteopontin, insulin benzeri büyüme faktörü II (IGF-II), makrofaj inhibitör faktör (MIF), CA-125

araştırma yapılarak testlerin klinikteki yararları değerlendirilmelidir. Yanlızca over kanserinin erken tanısında değil tedavinin yönlendirilmesinde de kullanılmak üzere biyobelirteç panelleri daha da geliştirilmelidir (Zhang ve diğ, 2011).

Over kanseri tanısında kullanılacak iki yeni test FDA tarafından onaylanmıştır. Birincisi, *OVA1* (Aspira Labs, A Vermillon Company, USA) olarak adlandırılan test pelvik kitlesi olan, 18 yaşından büyük kadınlara uygulanır ve 5 belirteci ölçer; transtiretin (=prealbümin), apolipoprotein A1, beta-2 mikroglobulin, transferrin ve CA-125. Bu protein temelli belirteçler iki farklı “immunoassay” ile değerlendirilir. Verilerin biyoinformatik analizinden sonra kanserleşme için risk oranı belirlenir (premenopoz vakalarında  $\geq 5,0$ ; postmenopoz vakalarında  $\geq 4,4$  oranı yüksek riski gösterir). Diğer klinik bilgilere veya tek başına CA-125’e nazaran over kanserini tayin etmede OVA1’in daha hassas olduğu rapor edilmiştir. Klinik değerlendirmeyle birlikte OVA1’ in özgünlük ve pozitif prediktif değeri, tek başına CA-125’ den daha kötüdür. Bu nedenle OVA1 testinin hastalar üzerindeki gerçek etkisi için araştırmaların devamı gerekmektedir (Ueland ve diğ, 2011; Tekkeşin, 2014). İkinci test olan *ROMA* (“*Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*”) ile CA-125 ve HE4 kullanılarak epitelyal over kanseri olan hastalar yüksek riskten düşük riske doğru sınıflandırılır (Montagnana ve diğ, 2011). Over kanserinin ayırıcı tanısında hassasiyetinin % 72,9 olması ve bu değerin CA-125’ e göre daha üstün olması nedeniyle önemlidir (Moore ve diğ, 2008). İki test birbiriyle karşılaştırıldığında ROMA özgünlük ve maliyet açısından OVA1’e üstünlüğü gösterilir (Tekkeşin, 2014).

## 2.6. DOLAŞIMDA BULUNAN TÜMÖR MATERYALLERİ

Non-invasiv tümör tanı ve taraması tıpta önemli bir yaklaşım haline gelmiştir. Dokudan biyopsinin aksine dolaşan tümör hücrelerinin (“circulating tumor cells-CTCs”) ve tümör nükleik asitlerinin tespiti (“circulating tumor DNA/RNA”) ile en az invasiv metotla prediktif ve prognostik belirteçler belirlenebilir. Böylece; gerilemenin takibi, tedavi etkilerinin belirlenmesi, klonal gelişim gibi hastalık hakkında erken ve çok sayıda değerlendirme yapılabilir. CTC’lerin ve dolaşan tümör DNA’larının (ctDNA) izolasyon ve nitelendirilmesi kanser tanısını, tedavisini ve görüntülenmesini geliştirecektir. Farklı

tümör tiplerine uygun moleküler belirteçlerin klinik kullanımı için daha çok çalışma yapılması gerekir (Gold ve diğ, 2015).

### **2.6.1. Serbest Tümör Hücreleri (CTC)**

Bazı durumlarda tümör hücreleri mezenşimal karakter göstererek fenotipik olarak değişir (Tomaskovic-Crook ve diğ, 2009; Micalizzi ve diğ, 2010; Chen ve diğ, 2011; Drasin ve diğ, 2011; Nieto, 2011; Strauss ve diğ, 2011). Bu değişim ile tümör başlatıcı hücreler orijinin etrafındaki dokuları istila eder (Chen ve diğ, 2011; Debnath ve Brugge, 2007; Brabek ve diğ, 2010; Groger ve diğ, 2012; Salnikov ve diğ, 2012). Çoğu karsinoma için bazal membranın bölgesel invazyonu, damar dışına çıkmadan önce gerçekleşir (Kramer ve Vogel, 1984; Liotta ve Stetler-Stevenson, 1991; Loriger ve Felding-Habermann, 2010; Pavese ve diğ, 2010). Dolaşıma (veya lenfatiklere) giren, tümör yüzeyinden kopan hücreler dolaşımda bulunur. Damar içinde bölünmeden kalabilirler, birleşerek yayılabilirler ya da yeni bir dokuya yerleşerek metastaz formunu oluştururlar. CTC'lerin yolu ne olursa olsun bu hücreler tümör kompozisyonuna, yayılabilmeye, ilaç duyarlılığına ve tedaviye vereceği yanıtı ait önemli bilgileri taşır (Gold ve diğ, 2015). Ortalama bir karsinoma hastasında yaklaşık 7.5 mL kanda 5-50 CTC bulunur (<1 ile >5 CTCs/mL) (Allard ve diğ, 2004; Cristofanilli ve diğ, 2007; Ross ve Slodkowska, 2009; Hou ve diğ., 2013). Mutasyon taşıyan ve yenilenme özelliği olan tümör kök hücre popülasyonunun varlığı nedeniyle, CTC sayısının azlığı teknik olarak sınırlamalara yol açar (Szotek ve diğ, 2006; Britton ve diğ, 2012; Tirino ve diğ, 2013). CTC'lerin görüntülenmesi ve lökositlerden ayrılması güvenilebilir hücre yüzey belirteçlerine bağlıdır. Günümüzde yeni teknolojilerle CTC'lerin hasta kan örneklerinden izolasyonu ilk defa yapılmıştır (Hou ve diğ., 2013; Yu ve diğ., 2011; Williams, 2013). Diğer metotlarda CTC izolasyonu için CTC'lerin fiziksel özelliklerinden yararlanılmıştır (Loberg ve diğ., 2004). CTC'lerin düşük-hızdaki santrifüjde çökelmelerine dayanarak lökosit fraksiyonlarından ayırımı sağlanabilir (Gossett ve diğ., 2010). Ayrıca, genelde lökositlerden daha büyük olan CTC'ler boyut temelli filtreler kullanılarak zenginleştirilebilir ve akyuvarlardan ayrılabilir (Vona ve diğ., 2000). Yeni çıkan bir teknikte ise CTC yüzeyinde bulunan sağlıklı kan hücrelerinde bulunmayan epitelyal hücre adezyon molekülüne (EpCAM) karşı antikor tekniğine dayanarak CTC izolasyonu yapılmıştır (Williams, 2013; Tveito ve diğ., 2011; Nadal ve diğ., 2013).

CTC metastatik ve nüks tümörleri bulunan hastaların periferik kanlarından tespit edilebilir. Birçok çalışmada CTC sayısı ile hastalığın şiddeti arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Örneğin, kanında daha az CTC bulunan hastalar daha çok bulunanlara göre daha uzun yaşadığı gösterilmiştir (Cristofanilli ve diğ., 2004). Yeni yapılan araştırmalarda CTC'lerin taşıdığı genetik mutasyonlar primer tümördekilerle karşılaştırılıp hastalığın evresi, seviyesi ve metastazı ile ilişkilendirilir (Maheswaran ve diğ., 2008).

### **2.6.2. Serbest Dolaşan ve Tümör Hücre DNA'sı**

Kanser hastalarının plazmalarında daha çok hücre dışı serbest DNA (cfDNA) bilinir (Shapiro ve diğ., 1983). Dolaşımda bulunan tümör DNA'larında (ctDNA) bulunan mutasyon, mikrosatellitlerin heterozigotite kaybı, CpG adalarının metilasyonu gibi tümör spesifik anomalilerle kanda ctDNA'ların varlığı kanıtlanmıştır (Nawroz ve diğ., 1996; Esteller ve diğ., 1999; Silvia ve diğ., 1999). cfDNA'ların kaynağının ölü (nekrotik, apoptotik, fagositozik) hücreler olduğu ileri sürülmüştür (Jahr ve diğ., 2001). DNA'ların nükleozomal boyutlarına dayanarak apoptozun cfDNA'ların esas kaynağı olduğu düşünülür (Stroun ve diğ., 2000). Ayrıca canlı hücrelerden de DNA salınımı olduğu genomastaz teorisiyle desteklenerek ortaya konmuştur (Stroun ve diğ., 2000). Genomastaz teorisi DNA'nın transfeksiyon ile başka hücreye transfer edilerek aktif olarak transkripsiyonunun yapılmasıdır (Garcia-Olmo ve diğ. 2001; Holmgren ve diğ., 1999).

CtDNA kullanarak tümör görüntüleme kanserin tanı ve taramasından daha gelişmiş ve geleceğe dönüktür. Çünkü daha önceden belirlenmiş, analiz edilmiş, hastalığa özel anomalileri araştırmak bu yöntemi daha uygulanabilir kılmıştır ( Gocke ve diğ., 2000).

Tümör ve kan biyobelirteçlerinin beraber kullanılması kadar CfDNA konsantrasyonu ile kandan elde edilen diğer biyobelirteçlerin birlikte kullanılması da yararlı olabilir. Bu ilişkilerin kurulabilmesi için çok merkezli daha ileri analizler yapılmalıdır (Schwarzenbach ve diğ., 2011; Roth ve diğ., 2011).

### **2.6.3. Serbest Dolaşan RNA (cfRNA)**

Kanser hastalarının plazmasından dolaşan gen transkriptlerini de tespit etmek mümkündür (Gahan, 2012). Hücre dışı mRNA'lar ilk olarak 1999'da melanoma hastalarının dolaşımında keşfedilmiştir (Kopreski ve diğ., 1999). Melanosit-spesifik tirozinaz mRNA'ları partiküllenmiş ve paketlenmiş formda bulunmuştur. Bu keşfi daha sonra diğer RNA formlarının özellikle miRNA'ların plazma ve serumda bulunması izlemiştir (Taylor ve Gercel-Taylor, 2008; Mitchell ve diğ., 2008; Lawrie ve diğ., 2008). Kanser hücreleri normal dokulara göre çok faklı gen anlatım profiline sahiptir. Bu fark kanser hastalarının dolaşımında tümör spesifik gen transkriptlerinin tespiti ile tanıda kullanılabilir (Zhou ve diğ., 2012). Kanda bulunan yüksek miktardaki RNaz'a rağmen dolaşımında bulunan RNA'ların şaşkırtıcı şekilde stabil olduğu görülmüştür. Bu durum RNA'nın hücre zarında kan dolaşımına geçen eksozomlar (mikropartiküller, mikrovessiküller, multivesiküller gibi) tarafından yıkımdan korunmuş olma olasılığıyla açıklanabilir. RNA'nın tespiti ve tanımlanması mikroarray, kantitatif "Real-time PCR" gibi birçok teknikle yapılabilir (Chen ve diğ., 2012). Hızla gelişen ve artan çalışmalara göre kanda bulunan mRNA'lar prognostik ve prediktif biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Bunun yanında, cDNA'da olduğu gibi ctRNA çalışmalarında da geniş kapsamlı olması, tümör davranışıyla ve kanda bulunan biyobelirteçler ile arasındaki ilişkinin kurulması konusunda eksiklikler vardır (Pucciarelli ve diğ., 2012).

### **2.6.4. Serbest Dolaşan miRNA**

Hücre dışı miRNA'ların salınma ve biyolojik fonksiyonları hala tam anlaşılmış değildir (Gold ve diğ., 2015). Kanser hastalarında kanda bulunan miRNA'ların dokudakilerle aynı öneme sahip olduğu gösterilmiş ve çalışmaların bazılarında solid tümörlerle kandaki miRNA anlatım profilleri arasında ilişki araştırılmıştır (van Schooneveld ve diğ., 2012, Mitchell ve diğ., 2008). Dolaşan miRNA'lar hücreye bağlı değildir fakat mikrovessikül, eksozom, mikropartikül, apoptotik cisim, protein-miRNA komplekslerine bağlanarak endojen RNaz yıkımına karşı korunur (Vickers ve diğ., 2011). miRNA'lar yüksek sıcaklık, düşük/yüksek pH, uzun süre saklama ve fazlaca uygulanan dondur/çöz gibi ağır koşullara dayanıklıdır (Gold ve diğ., 2015). Dolaşan miRNA seviyesinin ölçümü zordur çünkü farklı hematopoetik orijinli hücrel miRNA'lar ile kontamine olabilir (Gold ve diğ., 2015). Dolaşan miRNA'ların izolasyon ve stabilizasyon protokollerinin standart hale gelmesi ve kanser hasta plazmasından tek molekül

düzeyinde selektif olarak tespit edilebilir olması gerekmektedir (Hastings ve diğ, 2012). Yeni nesil dizileme ve anlatım profillemeye gibi tekniklerle kandan miRNA analizi yapılabilir ve tümörün ilerlemesiyle ilişkilendirilebilir (Qiu ve diğ, 2013; Giovannetti ve diğ, 2012).

Çalışmalara göre normal dokuya göre tümör dokusunda miRNA anlatımı değişiklik gösterir ve bu değişimler sağlıklı bireylere göre kanser hastalarının serum/plazma örneklerinde de tespit edilebilir (Godfrey ve diğ, 2013). Düşük oranda fark tespit edilmesi nedeniyle daha ileri çalışmalar önerilmektedir (Gold ve diğ, 2015).

#### **2.6.5. Eksozomlar ve Dolaşan Mikrovesiküller**

Mikrovesiküller ve eksozomlar membran bağımlı küçük hücre molekülleridir (boyutları 30-1000nm dijametre) yakın zamanda klinik olarak kullanılabilirleri keşfedilmiştir (Bang ve Thum, 2012; Simpson ve diğ, 2009). Eksozomlar farklı mekanizmalarla oluşurlar; multivesiküler cisimler plazma membranına füzyon olduğunda hücreden ayrılabilirler ya da doğrudan plazma membranından kökenlenirler (Gold ve diğ, 2015). Dolaşımdaki mikrovesiküller gibi eksozomların da özel fonksiyonlarının olduğu ve pıhtılaşma, hücreler arası sinyalleşme, artıkların yönetilmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Dolaşan her iki hücre parçası da farklı vücut ve dokular arası sıvılarda bulunur (Muralidharan-Chari ve diğ, 2010; Camussi ve diğ, 2010).

Dolaşan mikrovesiküller spesifik hedef hücrelerle etkileşir ve biyoaktif görev yapması için hücre dışına salınır (Vlassov ve diğ, 2012). Çoğu karsinomada dolaşan mikrovesikül seviyesi artmıştır (Katsuda ve diğ, 2014). Bu değişimle mikrovesiküller ileride hastalık şiddeti göstergesi olarak kullanılabilir (Thakur ve diğ, 2014; Li ve Bahassi, 2013). Ayrıca mikrovesiküllerin biyokimyası; biyokimyasal ve moleküler tümör evrelemede belirteç olarak kullanılabilir (Rabinowits, 2009; Skog ve diğ, 2008).

### **2.7. OVER KANSERİ TANISINDA MİRNA ANLATIM ANALİZİ TEKNOLOJİLERİ**

MİRNA alanındaki hızlı ilerlemeler ve araştırmalar miRNA anlatım profillemeye için kullanılacak tekniklerin de hızla gelişmesine yol açmıştır. Fakat miRNA'ların prob seçimini sınırlayan küçük boyutları, birbirinden çok farklı anlatım seviyeleri, poliA



kuyruğunun olmaması, aynı aileden olanların arasındaki önemli dizi homolojileri, hedef mRNA'larla tam olarak homoloji göstermeyen hibridizasyonları gibi özellikleri nedeniyle kantitasyonları zor yapılmaktadır. Bu zorlukları aşmak amacıyla son yıllarda daha hassas, spesifik, kantitatif, geniş biyolojik örnek skalasında analiz yapmaya uygun teknikler geliştirilmiştir (Fan, 2012).

miRNA tespit ve ölçüm yöntemlerinin çoğunluğu mRNA anlatım analizi ve DNA kopya sayısını değerlendiren array-temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH) yöntemlerinden alınmıştır. mRNA ve kopya sayısı değişimlerinde mikroarray rutin olarak kullanılmakta ve kliniğe uygulamada büyük ilerleme kaydedilmiştir. Son zamanlarda ise bu iki alanda da analizler çoğunlukla "next-generation sequencing"(NGS) ile yapılmaktadır (Bashir, 2010; Montgomery ve diğ, 2010). Ayrıca miRNA NGS klinik sonuçların tahmininde kullanılan oldukça yararlı bir teknik olmuştur (Aldridge ve Hadfield, 2012).

### **2.7.1. Revers-Transkripsiyon Kantitatif PCR (RT-qPCR)**

"RT-qPCR" protokolleri çok çeşitlidir fakat temel olarak RNA'nın cDNA'ya dönüşmesi, standart referans genlere veya örneklerle göre lokus spesifik kantitasyonuna dayanır. Tekrar dizileme aynı hassaslığa sahip olmasına rağmen şu anda en hassas uygulanabilir teknik "RT-qPCR" olup hem "TaqMan" problemleri hem de "SYBR Green (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl (benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium)" ile uygulanabilir (Fan ve diğ, 2008; Aldridge ve Hadfield, 2012). TaqMan prob temelli teknikte gen spesifik "stem-loop" primerler kullanılarak hem prekürseör hem de olgun miRNA'ların ters transkripsiyonu gerçekleşir (Heid ve diğ, 1996; Chen ve diğ., 2005; Schmittgen ve diğ., 2008). "SYBR Green" temelli teknikte işaretli ve bağlı oligo-dT primerlerle küçük RNA'ların poliadenillenmiş kuyruğunun ters transkripsiyonu gerçekleşir böylece olgun miRNA'ların bu teknikle tespiti yapılabilir (Schneeberger ve diğ.,1995; Shi ve Chiang, 2005). MiRNA'nın orta-yüksek veri elde edilebilecek analizleri ("medium/highthroughput") son yıllarda en çok ilgi gören alan olmuştur. Böylece birçok örnekte paralel olarak onlarca ya da yüzlerce miRNA'nın değerlendirilmesi "assay plate"leriyle mümkündür (Morrison ve diğ, 2006; Spurgeon ve diğ., 2008). Eğer analize uygun çok fazla sayıda örnek varsa "RT-qPCR" ile ölçümler zorlaşır.

mRNA'nın aksine miRNA "RT-qPCR" belirtilmiş olan sınırlamalar nedeniyle kısıtlanır (Aldridge ve Hadfield, 2012).

### 2.7.2. "In-situ" hibridizasyon (ISH)

In-situ hibridizasyon (ISH) ile direkt ilgili dokuda; kompleks bir organda ya da heterojen tümörlerde bulunan spesifik hücre tiplerinde miRNA anlatım analizi yapılabilir. Çok fazla veri elde edilebilecek bir yöntem değildir ama genomda yapılacak miRNA analizinden önce uygulanmasıyla validasyon için önem kazanır. miRNA "ISH" üzerine birçok çalışma vardır, genelde kilitli nükleik asit problemleri ("Locked Nucleic Acids-LNA") kullanılır. "LNA problemleri" standart olanlara göre RNA'ya ve miRNA'ya daha fazla hibridizasyon afinitesi vardır (Kloosterman ve diğ., 2005; Válóczy ve diğ., 2004, Wienholds ve diğ., 2005). LNA'ların birleşmesiyle prob/RNA kompleksinin termal stabilitesi artar (Thomsen ve diğ., 2005). miRNA analizi için gerekli kısa problemler açısından bu özellik çok önemlidir. Düşük sinyal gücü "LNA prob"larının dezavantajlarından; bu sorun 3' ve 5' işaretli problemler kullanılarak aşılabılır (Obernosterer ve diğ., 2007; Aldridge ve Hadfield, 2012).

### 2.7.3. Mikroarray

Aday miRNA'ların tanımlanması için mikroarray temelli anlatım analizleri ideal bir tekniktir çünkü istenilen yüzlerce örnekte miRNA anlatım analizi yapılabilir ve "high-throughput" veri elde edilebilir (Aldridge ve Hadfield, 2012). MiRNA mikroarray teknolojisi normal ve tümör örnekleri arasındaki miRNA anlatım farklarını tespit etmek için çok güçlü bir tekniktir (Iorio ve diğ., 2007; Iorio ve diğ., 2005; Calin GA; 2006, Esquela-Kerscher ve Slack, 2006). Ayrıca belirli bir klinik ve patolojik özellik ya da hastalık etkisi miRNA anlatım analizi ile tespit edilebilir (Calin ve diğ., 2005; Yanaihara ve diğ., 2006). Yapılan araştırmalara göre değişmiş miRNA anlatımına neden olan moleküler mekanizmaların ve miRNA genlerindeki genomik anomalilerin mikroarray ile tespit edilebileceği gösterilmiştir (Calin ve diğ., 2005; Calin ve Croce ,2006b; Zhang ve diğ., 2006).

Kanser örneklerinde; PCR temelli miRNA profillemesi sonucu miRNA anlatımının azaldığı gösterilirken, erken mikroarray temelli miRNA profillemesi sonucunda miRNA'ların dengeli olarak "up"- ve "down"- regüle oldukları gösterilmiştir (Volinia ve diğ., 2006; Yanaihara ve diğ., 2006; Lu ve diğ., 2005; Wu ve diğ., 2013).

#### 2.7.4. Yeni Nesil Dizileme (“Next Generation Sequencing-NGS”)

NGS teknolojisi ilk olarak *C. elegans*'da küçük RNA dizilerini profillemeye için kullanılmış ve birçok küçük RNA türü bulunmuştur (Ruby ve diğ, 2006). Böylece NGS'nin küçük RNA analizi için büyük potansiyele sahip bir teknik olduğu gösterilmiştir. Geleneksel küçük RNA klonlama teknikleri temelli NGS kullanan metotlar için kütüphaneler hazırlanır. Küçük RNA moleküllerinin uçlarına adaptörler bağlanır ve dizileme için kalıp olarak kullanılır (Hafner ve diğ, 2008). Alternatif protokollerin ve metotların geliştiriliyor olmasına rağmen, NGS için küçük RNA klonlama metodunun teknik olarak zor olduğu ve zaman aldığı kanıtlanmıştır. NGS özellikle yeni küçük RNA türlerinin keşfi için uygundur çünkü bilinen bir diziye bağlanacak hibridizasyon problemlerinin kullanımına gerek yoktur. Dizileme teknolojisindeki ilerlemeler yeni miRNA'ların keşif oranını ve miRNA dizisinde zor farkedilen değişikliklerin (örneğin; post-transkripsiyonel düzenleme ve terminal bakiye eklenmesi) saptanma oranını arttırmıştır (Landgraf ve diğ, 2007). Yeni nesil dizileme cihazlarındaki artmış veri üretme kapasitesi küçük RNA kütüphanesi hazırlama metotlarındaki gelişmelerle birleştirilmiştir. Araştırmacılar daha çok veri elde etmek için küçük RNA kütüphanelerini indekslemede ve çoğaltmada bu metotlardan faydalanırlar. Veri normalizasyonu açısından diğer metotlara göre bir artışının olmaması; küçük RNA analizinde kullanılan diğer metotlar gibi bu yöntemin de olumsuz tarafıdır. Ayrıca NGS sonuçlarının değerlendirileceği bilgisayarlı veri analizleri yöntemleri hala gelişmekte olan alandır (Aldridge ve Hadfield, 2012).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. ÖRNEK TOPLAMA

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilerek 08.08.2014 tarih ve 13 sayılı kararla etik kurul onayı alındı. Örnek alınan tüm hastalardan bilgilendirilmiş onam formunun imzalı hali toplanmış ve hastalara proje hakkında gerekli bilgiler jinekolojik onkologlarımız tarafından verilmiştir. Serbest tümör nükleik asitlerde analiz yapmak için çalışılacak materyalin ve nükleik asitlerin kaliteli biçimde elde edilmesi gerekmektedir. Tümör RNA'larının kanda az miktarda olması, örnek taşıma ve saklama aşamalarının önemini artırmıştır. Proje kapsamında uygun örneklerin belirlenmesi, kan ve doku alım işlemleri İstanbul Tıp Fakültesi Jinekolojik Onkoloji Anabilim Dalı'ndan ve Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden gerçekleştirilmiştir. Çalışmada toplanan örnekler; sağlıklı bireylerden, primer epitelyal over kanser teşhisi konulmuş hastalardan, önceden over kanser geçmişi olup tekrar nüks etmiş hastalardan ve basit over kisti bulunan hastalardan toplanmıştır. 2 deney (over kanseri ve nüks) ve 2 kontrol (basit over kisti ve sağlıklı) olmak üzere toplam 4 araştırma grubuyla çalışılmıştır. Sağlıklı grubu hariç diğer araştırma gruplarından hem periferal kandan elde edilen serum hem de tümör (ya da kist) dokuları alınmıştır. Sağlıklı grubundan sadece serum alınmıştır. Alınan periferal kanlar ve dokular aynı gün soğuk zincir ile İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Tanı ve Analiz Birimi laboratuvarına transfer edilmiştir. İki deney grubu için de kanlar 10ml kırmızı kapaklı tüplerde alınıp 1300 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrılmıştır. Tümör ve kist dokularından yaklaşık 500 mg doku örneği, "RNA Later" stabilizasyon ve saklama solüsyonu içeren steril santrifüj tüplerinde alınarak bir gece +4°C'de bekletilmiş ardından izolasyon aşamasına kadar -80°C'de saklanmıştır. Bu çalışmada toplanan serum ve tümör veya kist dokularının tümünden izolasyon yapılmış ve elde edilen RNA kalitesi en yüksek olan 8'er örnek daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 3.1.).

**Tablo 3.1:** Araştırmada kullanılan deney grupları.

Çalışma grubu	Serum		Doku	
	Örnek sayısı	Saklama Koşulları	Örnek sayısı	Saklama Koşulları
Sağlıklı bireyler (Kontrol grubu 1)	15	-80°C	-	-
Basit over kisti hastaları (Kontrol grubu 2)	8	-80°C	11	-80°C
Over kanseri hastaları	12	-80°C	12	-80°C
Nüks grubu	9	-80°C	13	-80°C

### 3.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

#### 3.2.1. Serumdan total RNA izolasyonu:

İzolasyon aşamasında “*mirVana* miRNA izolasyon kiti” (“ambion by *life* Technologies”) kullanılarak firmanın önerdiği protokol takip edilir.

- 80°C de bulunan serum örneği buzda çözüldükten sonra iki farklı 2 ml’lik tüplere 250 µl alınarak, örneğin 2 katı kadar (500 µl) lizis tamponu buz içerisinde eklenir ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Total hacimle aynı miktarda *fenol:kloroform* eklenir (1:1). 30-60 saniye vortekslenir.
- Oda sıcaklığında 30 dk 10.000g’de santrifüj edilir. Örnek sulu ve organik faza ayrılır. Faz ayrımı gerçekleşmediği takdirde tekrar vortekslenip santrifüj işlemi 10.000g hızda 15 dakika tekrarlanır. En üst faz (sulu) yeni bir tüpe aktarılır. Aktarılan miktar not edilir.
- Elde edilen miktarın 1.25 katı kadar 100% etanol (oda sıcaklığındaki) eklenir.
- Her bir örnek için bir tane toplama tüpü kullanılır. Örneklerden 700’er µl filtrelili toplama tüplerine aktarılır. Her aktarımdan sonra 10.000g’de 15 saniye santrifüj

edilir. Altta kalan sıvı atılıp, toplama tüpü tekrar kullanılarak işlem tüm örnek aktarılanına kadar devam eder.

- f) Nukleazsız çözücü tampon 95 °C'de bekletilerek, daha sonraki aşama için hazırlanır.
- g) miRNA yıkama solüsyonu 1'den 700 µl toplama tüpüne eklenir. 10.000g'de 5-10 saniye santrifüj edilir.
- h) miRNA yıkama solüsyonu 2/3'den 500 µL toplama tüpüne eklenir. 10.000g'de 5-10 saniye santrifüj edilir. İşlem 2 kez tekrarlanır.
- i) Toplama tüpü boş olarak 1dk son hızda santrifüj edilir.
- j) Toplama tüpü yeni bir 2ml'lik tüpe aktarılır. 95 °C de bulunan nukleazsız çözücü tampondan 30 µL filtreye dokunmadan dikkatlice filtreye yayılır. Maksimum hızla 30sn santrifüj yapılır. Filtreler atılır ve miRNA içeren 2ml'lik tüpler -20 °C de saklanabilir.
- k) Elde edilen total RNA'ların konsantrasyonu nanodrop cihazında ölçülür ve sonuçlar kaydedilir.

### 3.2.2. Tümör ve kist dokularından total RNA izolasyonu

Tümör ve kist dokularından total RNA izolasyonu için "QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit" kullanılır. Kitin önerilen prosedürü aşağıda belirtilmiştir.

- Dokudan izolasyon yapılırsa 1 ml RLT Buffer'a 10 µl β- merkaptoetanol ( veya 20 µl 2M dithiothreitol DTT) eklenir. Bu karışım oda sıcaklığında en fazla 1 ay bekletilir.
  - Kit ilk defa açılacaksa; RPE buffer içine 4 volume EtOH eklenir.
- a) Doku önceden -20'de soğutulmuş havanda sıvı azot ile ezilir. Tüm bu aşamalar boyunca örneklerin buzda olmasına dikkat edilir. Ezilen örnekler 2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine koyulur. (30-60 mg olması tercih edilir.)
  - b) Örneklerin miktarına göre RLT buffer eklenir.
    - <20 mg → 350 µl
    - 20-40 mg → 600 µl
    - 40-60 mg → 800 µl
    - >60 mg → 1000 µl

Maksimum hızda 3 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant dikkatlice başka bir tüpe aktarılır.

- c) Yaklaşık 600 µl lizat “qDNA eliminator spin colum”a aktarılır. 30 s  $\geq$  8000 g ( $\geq$  10000 rpm) santrifüj yapılır. Filtreden geçen kısım ayrılır. Örnekler bitene kadar tekrarlanır.
- d) Sıvının üzerine toplam miktar kadar (eklenen RLT’ye göre) %70 (+4 °C) etanol eklenir. Pipetaj yapılarak karıştırılır. Santrifüj yapılmaz. Hemen sonraki aşamaya geçilir.
- e) 700 µl örnek “RNA easy spin column” a aktarılır. 15s x  $\geq$  8000 g santrifüj edilir. Geçen sıvı atılır. Örnek bitene kadar tekrarlanır.
- f) 700 µl “RW1 buffer” RNeasy spin column’a eklenir. 15s x  $\geq$  8000 g santrifüj edilir. Alta geçen sıvı atılır.
- g) 500 µl “RPE Buffer” eklenir. 2 dk. x  $\geq$  8000 g santrifüj edilir. Alta geçen sıvı atılır.
- h) Tekrar 500 µl RPE Buffer eklenir. 2 dk. x  $\geq$  8000 g santrifüj edilir.  
(İsteğe göre 2 ml toplama tüplerine filtreler geçirilir ve maksimum hızda 1 dakika boş santrifüj edilir.)
- i) Spin column 1,5 ml toplama tüplerine aktarılır. 50 µl RNazsız su eklenir. 1 dakika  $>$  8000 g santrifüj edilir.

Bioanalizörde bakmak üzere örnekten 2 µl PCR tüplerine ayrılır. Geri kalan örnekler -80’e soğuk zincir ile götürülür.

### **3.3. İZOLE EDİLEN RNA’LARIN BİYOANALİZÖRDE KONTROLÜ**

Nanodropta RNA’ların konsantrasyonunu belirlemek mikroarray uygulamasına geçmek için yeterli olmayabilir. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonunu ve kalitesini kontrol etmek için güvenilir ve hassasiyeti yüksek olan bir uygulama gerekmektedir. Günümüzde biyoanalizör uygulaması DNA, RNA ve proteinlerin kalite ve konsantrasyon ölçümünde hassas ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Biyoanalizör uygulamasında RNA kalite kontrolü ve konsantrasyon ölçümü için iki farklı kit kullanılmaktadır (“Nano RNA çip” ve “Small RNA çip”). Bu araştırmada “Agilent RNA 6000 Nano Kit” kullanarak, elde edilen RNA’ların konsantrasyonu

ölçülür ve mikroarray uygulamasına geçilir. Bu uygulamanın çip hazırlama ve örnek yükleme; biyoanalizör ölçümü; sonuç analizi olmak üzere üç basamağı bulunmaktadır (Şekil 3.1.).



**Şekil 3.1:** Biyoanalizör uygulama aşamaları.

Firmanın önerdiği protokol takip edilerek öncelikle jel-boya karışımı hazırlanır.

Kırmızı kapaklı jel ve mavi kapaklı boya 30 dakika önceden çıkarılır. 30 dakika sonrasında kitten çıkan filtrelili tüpe aktarılır (550  $\mu$ l). 1500 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılır. 65  $\mu$ l olarak RNazsız santrifüj tüplerine bölüştürülür (alikotalanır). Her bir tüp tek sefer kullanım içindir. +4°C'de saklanır. 30 dakika bekledikten sonra mavi kapaklı boyaya 10 saniye vorteks, ardından spin yapılır. 65  $\mu$ l alikotalanmış jelin birine 1  $\mu$ l boya eklenir ve tamamen karışana kadar vortekslenir. 13000 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılır. Bu karışım yalnızca bir gün kullanılır.

Kullanmadan önce kullanılmış ya da herhangi boş bir çip ile kontrol testi yapılır. Çip, yükleme aparatına konulur ve şırınga takılmış olan üst kısım yavaşça kapatılıp şırınga basılarak klips takılır. Klipsden kurtulduktan sonra 1 saniyede 3 konumuna gelmesi gerekir. Gelmez ise ya yeni bir şırınga takılır ya da yükleme aparatı temizlenir. Kontrol işlemi sonrası "RNA Nanochip" (Şekil 3.2.) jel yükleme aparatına konulur.





Şekil 3.2: “RNA Nano Chip” görüntüsü.

- ✓ Karşılaştırma yapılacak “ladder” ve tüm örnekler 2 dakika 70 °C’de inkübasyon yapılır. Ardından buza koyulur. 9 µl jel G kuyusuna koyulur. Enjektör 1 ml konumuna getirilir (klips’i en üst seviyede olmalıdır.) (Şekil 3.3.). Enjektör klips ile tutulana kadar bastırılır. 30 saniye beklenir. Klips serbest bırakılır. Yavaşça 1 ml konumuna getirilir. Diğer G kuyularına 9’ar µl jel – boya konur. Geri kalan karışım atılır. Kuyuları hariç hepsine 5 µl belirteç konulur (ladder kuyucuğu dahil). # kuyusuna 1 µl “ladder” konur. Diğer 12 kuyucuğa 1’er µl örnek yüklenir. “1 KA MS 3 Vortexer” ile 1200 rpm’de 2 kere vorteks yapılır.



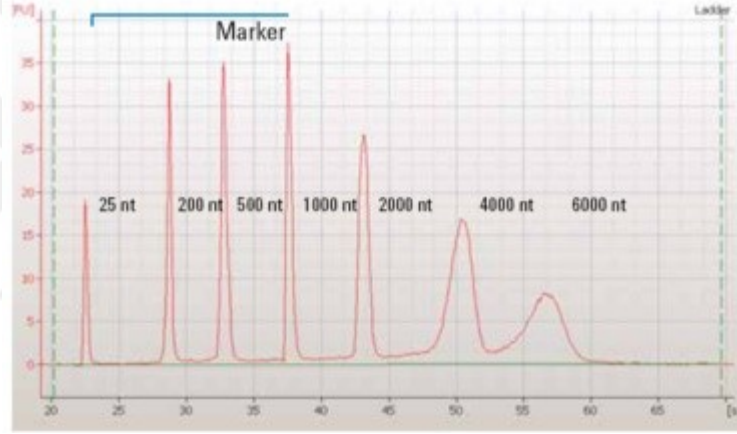
Şekil 3.3: Hava basıncı enjektörü ve çip yükleme aparatı.

Örnek yüklenmiş “RNA Nano Chip” analiz edilmek üzere “Agilent Bioanalyzer 2100” cihazına koyulur;

- a) Bu aşamada biyoanalizöre çip koyulmadan önce biyoanalizörün elektrotları yıkama çipleri kullanılarak iki kademedede yıkanır. İlk aşamada, %100 etanolden yıkama çipinin koyu G kuyucuğuna 350 µl eklenir ve biyoanalizörde çip konumuna

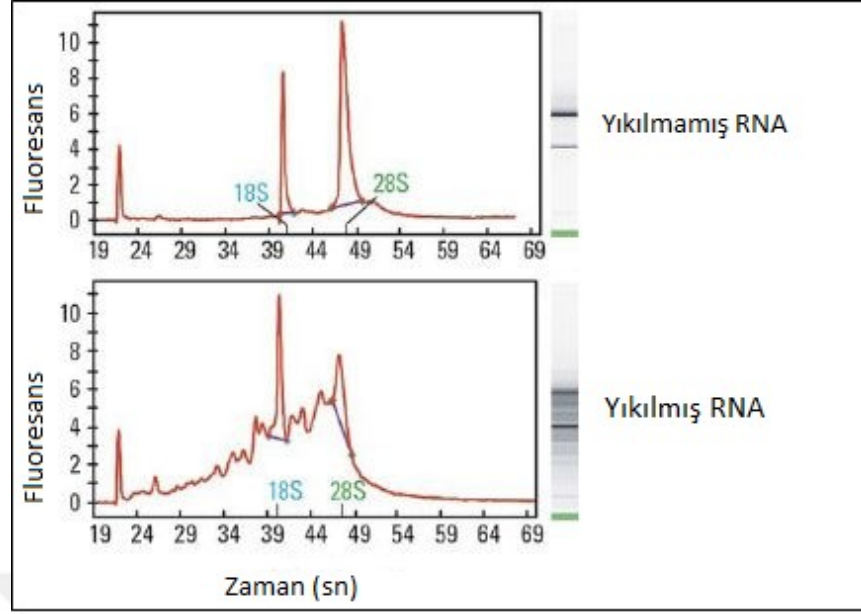
yerleştirilir. Bir dakika bekletilir ve yıkama sağlanır. Diğer aşamada 350 µl dH<sub>2</sub>O başka bir yıkama çipine eklenir ve 1 dk yıkama gerçekleşir. Bu aşamadan sonra cihaz çip analizine hazırdır.

- b) “RNA Nano” çipi biyoanalizör konumuna yerleştirildikten sonra çalıştırma programı bilgisayar aracılığı ile yapılır ve yürüme başlatılır. Yürüme olurken aynı anda tek tek kuyucuklarda bulunan örneklerin ölçümü izlenebilir.
- c) Yürümekte olan her örneğin verileri kayıt edilir.
- d) Bu aşamada önemli olan nokta, boyutları bilinen RNA parçalarından (ladder) elde edilen sonucunun beklenen pik sayısına ve boyutuna sahip olmasıdır. Bu çipte kullanılan “ladder” için 7 pik (şekil 3.4.), 25, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 nükleotid (nt) bulunması gerekmektedir.



**Şekil 3.4:** “Ladder” kuyucuğun elektroferogram görüntüsü.

- e) Her örnekten elde edilen sonuçlar hem jel hem elektroferogram görüntülerinde şekil 3.5. gösterildiği gibi değerlendirilebilir.



**Şekil 3.5:** RNA 6000 Nano analiz sonucunda elde edilen yıkılmamış ve yıkılmış RNA görüntüleri.

Bu araştırmada izole edilen tümör ve kist örnekleri için biyoanalizörde RNA konsantrasyonu ölçüldü ve sonuçları değerlendirildi. RIN (“RNA Integrity Number”) değerleri 6-9 arasında değişen örnekler ileri analizler için seçildi. Serumdan elde edilen RNA’lar nanodropta ölçülüp ileri analizlere gidilmiştir. Çünkü serbest RNA konsantrasyonu kan serumunda çok az miktarda bulunur.

### 3.4. MİKROARRAY UYGULAMASI

Çalışmada; yüksek verimli miRNA anlatım profillemesi sistemi kullanılarak olgun miRNA’ların dizi ve boyut farklılıkları bir arada değerlendirilerek yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte sonuçlar elde edilmektedir. Bu teknolojiye tasarlanan problarda, ek olarak uzatılmış saç tokası yapısı bulunmaktadır ve probun hibrit olan bölgesinin 5' ucunda G bazı tasarlanmıştır. Bu baz hedef miRNA’nın 3' ucunda floresan boya ile işaretlenen C bazı ile stabil bir hidrojen bağı kurar.

Bu araştırmada biyoanalizörde ölçümleri yapılan serum ve doku RNA’larının mikroarray uygulamasında kullanılmak üzere uygun konsantrasyon için normalizasyon gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri 50 ng/µl’ye ayarlanmıştır. Tümör ya da kist dokusu örneği bulunan tüm gruplarda yapılan kalite kontrol sonucunda RIN değeri 6-9 arası olan ve konsantrasyonu 100ng/µl’den fazla olan örneklerden 8’er tane seçilmiştir.

Serum RNA'ları için ise nanodrop sonucuna dayanarak konsantrasyonu 1-12 ng/ $\mu$ l olan 8'er tane RNA örnek "Agilent SureScan Microarray Scanner" (Şekil 3.6.) ile taraması yapıp "Feature Extraction Software v12.0" ve "Agilent Gene Spring Version 12.6" yazılımlarıyla analiz edilmiştir.



Şekil 3.6: Agilent mikroarray tarayıcı.

### 3.4.1. İzole Edilen RNA'ların Mikroarraye Hazırlanması

- Serumdan elde edilen miRNA miktarı düşük olduğu için öncelikle konsantrasyonunun yükseltilmesi gerekir. Bunun için vakum cihazında "Savant™ DNA SpeedVac™" cihazı kullanılarak 45-55 °C 30 dk örneklerin tamamen kuruması sağlanır ardından her örnek için 4  $\mu$ l RNaz içermeyen su eklenir. Vorteks yapılır, ardından spin atılır ve buzda bekletilir.
- Tümör ve kist dokularından elde edilen ve uygun RIN değerine sahip RNA örneklerinin konsantrasyonu nanodrop cihazı kullanılarak 50 ng/  $\mu$ L'de birbirlerine eşitlenir ve buzda bekletilir.

### 3.4.2. İşaretleme

#### 3.4.2.1. "Spike-in" Solusyonunun Hazırlanması

- 198  $\mu$ L çözücü tampon boş bir mikrosantrifüj tüpüne koyulur.
- İşaretleme "spike-in" solüsyonundan 2  $\mu$ L üzerine koyulur. Vorteks yapılır.
- İki yeni tüp çıkarılır birine "çözücü 2" diğerine "çözücü 3" yazılır. Her birine 198  $\mu$ l distile su koyulur.
- "Çözücü 1" yazan tüpten 2  $\mu$ l "çözücü 2" yazan tüpe aktarılır ve vorteks yapılır. Daha sonra "çözücü 2"den 2  $\mu$ l alınarak "çözücü 3" yazan tüpe aktarılır.

- e) “Çözücü 1”, -80°C de saklanır. “Çözücü 3” çalışmada kullanılacak solüsyondur. Çözücü 2 ve 3 kullanıldıktan sonra atılır.

#### 3.4.2.2. İşaretleme (Labelling)

“Agilent miRNA Complete Labeling and Hyb Kit” kullanılarak işaretleme yapılır.

- Total RNA 50 ng/ µl nükleazsız su ile seyreltilir. Her tüpe 2 µl örnek eklenir.
- “CIP master mix” tablo 3.2.’de verilen değerlere göre hazırlanır.
- CIP master mix den her tüpe 2 µl dağıtılır ve total hacim 4 µl olur. 37°C de 30 dk inkübe edilir.

**Tablo 3.2:** “CIP Master Mix” hazırlanması.

İçerik	1 örnek için miktar (µl)	9 örnek için miktar (µl)
“10X Calf Intestinal phosphatase Buffer”	0.4	3.6
“Labeling Spike-in”	1.1	9.9
“Calf Intestinal Phosphatase”	0.5	4.5
Total miktar	2	18

#### 3.4.3. Denatürasyon

- İnkübasyondan sonra her örneğe 2,8 µl %100 DMSO(dimetil sülfoksit) eklenir.
- 100 °C su banyosunda 5-10 dakika bekletilir.
- Bu süre sonrasında örnekler hızlı bir biçimde sulu buza aktarılır. Maksimum 10 dakika bekletilir.

#### 3.4.4. Ligasyon ve örneklerin kurutulması

- 10x T4 RNA Ligaz tamponu 37 °C de 5-10 dakika bekletilir içeriği tamamen çözümlene kadar vorteks yapılır.
- Oda sıcaklığına ulaşıncaya kadar beklenir.
- Tablo 3.3.’e göre “Ligation Master Mix” hazırlanır ve her örneğe 4,5 µl eklenir.
- Ardından 16 °C’de 2 saat inkübasyon yapılır.
- Ardından örnekler vakum cihazı kullanılarak 45-55 °C de 3 saat kurutulur. Kurutmadan sonra her örneğe 18 µL nükleazsız su eklenir.

**Tablo 3.3:** Ligasyon karışımı hazırlanması.

İçerik	1 örnek için miktar $\mu\text{l}$	9 örnek için miktar $\mu\text{l}$
“10X T4 RNA Ligase Buffer”	1	9
Cyanine 3-pCp*	3	27
T4 RNA ligaz	0.5	4.5
Total miktar	4.5	40.5

#### 3.4.5. 10X “blocking agent” hazırlama

- Agilent miRNA işaretleme kitinde bulunan, “10X GE Blocking agent”e 125  $\mu\text{l}$  nükleazsız su eklenir.
- Ardından 4-5 dakika 37 °C de inkübasyon gerçekleşir
- 17000 g de 5-10 saniye santrifüj yapılır. -20 °C de 2 ay kadar bekleyebilir.

#### 3.4.6. Hibridizasyon ve Slaytlara Örnek Yükleme

- Tablo 3.4.’de belirlenen sıraya göre, PCR tüplerine pipetaj yaparak solüsyonlar eklenir.
- Ardından 100 °C de 5 dakika bekletilir.
- 5 dk dolduktan sonra beklemeden buzlu suya konur ve 5-15 dakika bekletilir.

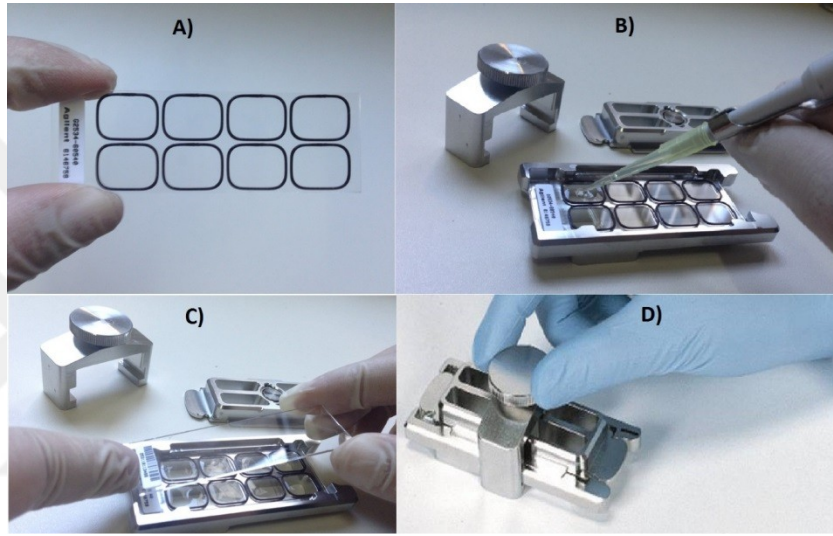
**Tablo 3.4:** İşaretleme karışımı.

İçerik	Miktar ( $\mu\text{l}$ )
İşaretlenen miRNA örnek	17
“Hyb spike-In”	1
10X GE blocking agent	4.5
2X Hi-RPM Hibridizasyon tamponu	22.5
Total miktar	45

Buzda bekletildikten sonra yükleme aşamasına geçilir (Şekil 3.7.).

- Mikroarray lam tutucuları hazır hale getirilir.

- b) Lastikli lamlar tutucuya yerleştirilir, her lamda iki sıra ve her sırada dört bölge olmak üzere toplam sekiz bölge bulunmaktadır. Sekiz bölgenin her birine 45 µl örnekten dikkatlice kenarlara değdirmeden yüklenir. (Şekil 3.7. A ve B)
- c) İnsan miRNA'problarını içeren lam (1370 insan miRNA probunu içermektedir), lastikli lamın üstüne konulur ve tutucu kapatılır. (Şekil 3.7. C ve D)
- d) Bölgelerde bulunan örneklerin lam üzerinde hareket edebileceğinden emin olduktan sonra; tutucu 56 °C 20 rpm hızda 22-24 saat inkübe edilir.



**Şekil 3.7:** A) 8 bölgeci lastikli lam. B) Lastikli lama örnek yükleme pozisyonu C) İnsan miRNA prob lam yerleştirme pozisyonu D) Lam tutucusun hazır hale getirme.

Bu sırada yıkama için kullanılacak olan yıkama solusyonlarından “Gene Expression Wash Buffer 2” gece boyu inkübasyona bırakılmalıdır. Bunun için yıkama kaplarından biri önce distile su ile, ardından asetonitrille ve son olarak tekrar distile su ile yıkanır. Temiz kaba az miktarda “Gene Expression Wash Buffer 2” koyularak çalkalanır ve dökülür. “Gene Expression Wash Buffer 2” ile kap tamamen doldurulup hava almayacak şekilde parafilmle kaplanır. 37 °C’de bir gece boyunca bekletilir.

### 3.4.7. Yıkama ve Çip Tarama

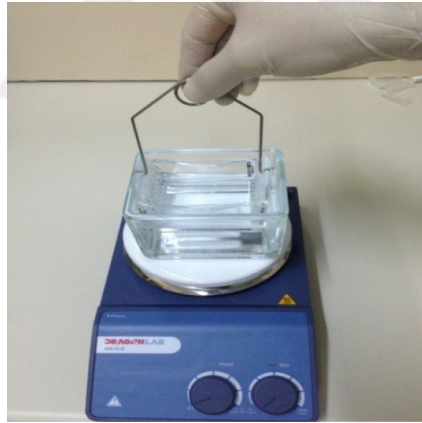
- a) Hibridizasyondan fırınından alınan slaytlar prob lamının lastikli lamdan ayrımını gerçekleştirmek üzere “Gene Expression Wash Buffer 1”e konulur. Kitten çıkan plastik cımbız yardımıyla lam ve lastikli lam birbirinden ayrılır. Bu aşamada lastikli

lamın yıkama kabının taban kısmına gelmesine dikkat edilmelidir. Ardından 1. yıkama aşaması ve 2. yıkama aşaması gerçekleştirilir (Şekil 3.8.) ( Tablo 3.5.).

b) Yıkama aşamalarından hemen sonra miRNA prob lamı lam tutucuya aktarılır ve mikroarray tarama cihazında taraması gerçekleşir (Şekil 3.9.A).

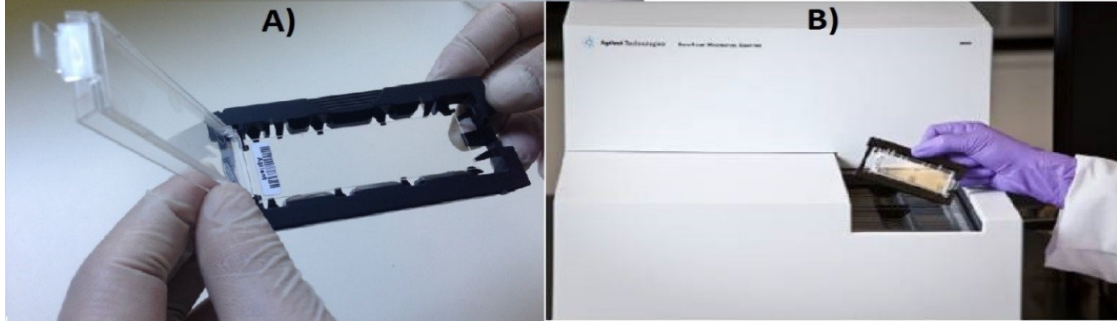
**Tablo 3.5:** Yıkama aşamaları.

İçerik	Yıkama kabı	Yıkama buffer	Sıcaklık	Zaman
Prob lam ve lastikli lam ayrılması	1	GE yıkama 1	RT	
1. yıkama	2	GE yıkama 1	RT	5 dk
2. yıkama	3	GE yıkama 2	37°C	5 dk



**Şekil 3.8:** Yıkama kabında slayt tutucu yardımıyla yapılan yıkama.



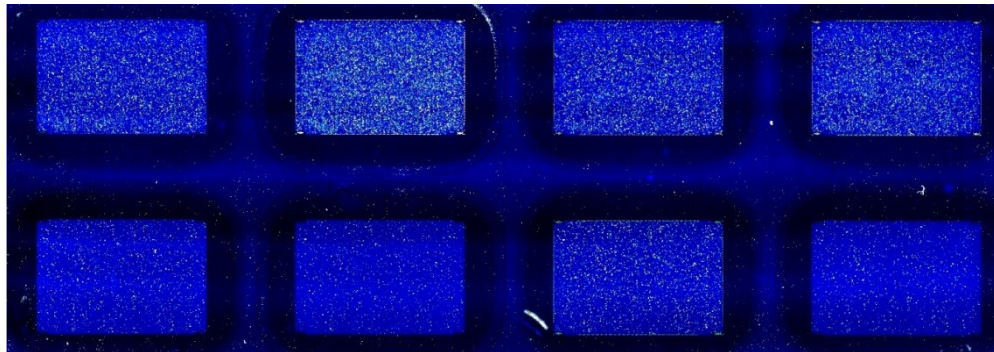


**Şekil 3.9:** A) Taramaya hazır lamı lam tutucuda yerleştirme B) Lam tutucusunu mikroarray tarayıcıya yerleştirme.

- c) Çipin taranması aşamasında çip tutucuda bulunan lam “Agilent SureScan Microarray Scanner” tarama cihazına yerleştirip (Şekil 3.9., B) “AgilentG3\_miRNA” programı ile tarama işlemi başlatılır. Her lam için yaklaşık 30 dk tarama yapılır.

### 3.5. SONUÇ DEĞERLENDİRME VE ANALİZ

Tarama sonrası şekil 3.10.’da gösterilen yüksek çözünürlüklü “.tiff” uzantılı dosyalar halinde sonuçlar elde edilir. Bu “.tiff” dosyaları “Feature Extraction Software”e yüklenerek değerlendirilmesi yazılım tarafından yapılır. Her bir kuyucuk (örnek) için ayrı olmak üzere sonuçlar elde edilir. Bu ilk değerlendirme sonuçlarında yapılan mikroarray uygulamasının ve örneklerin kalite kontrolü analiz edilir. Hibridizasyonun, işaretlemenin, örneklerin ve yıkama aşamasının kalitesi bu dosyadan kontrol edilebilir.



**Şekil 3.10:** Tarama sonrası elde edilen “.tiff” uzantılı slayt görüntüsü.

## **Biyoinformatik analizi:**

QC (kalite kontrol) değerlendirmesi yapılan “text” dosyaları esas değerlendirme programı olan “Agilent Gene Spring Version 12.6” biyoinformatik programında değerlendirmeleri yapılmıştır. Doku örnekleri slaytları kendi aralarında, serum örnekleri slaytları kendi aralarında değerlendirilmiştir. Ortak bulunan miRNA’lar ise en son değerlendirme olarak incelenmiştir.

Çalışmada nüks (N), over kanseri (O) ve basit over kisti (K) olmak üzere toplam 3 deney grubundan doku örneği alınmıştır. Basit over kisti örnekleri, doku miRNA’larını değerlendirmede kontrol olarak kullanılmıştır çünkü bu kitleler kanserleşme özelliği göstermeyen hücre topluluklarından alınmıştır. İki grubu karşılaştırırken; önce istatistiksel analizlerinden “Multiple Testing Correction: Bonferroni FWER” (T test: corrected p-value cut-off  $>0.05$ ) testini geçen ve anlatımı anlamlı değişen miRNA’lar belirlenmiştir. Ardından anlatım kat sayısı (fold change $\geq 2$ )(FC) 2 veya daha büyük olanlara göre ileri elemeler yapılmıştır. Üç grup değerlendirilirken ANOVA (“Analysis of Variation”) diğer ismiyle F testinin kullanılması istatistiksel açıdan daha doğru sonuç alınmasını sağlar. Bu testten geçen miRNA’ların anlatım katsayısı 2’den büyük olanlar değerlendirilmiştir. Bir sonraki aşamada o miRNA’ların hedefledikleri genler ve o genlerin rol oynadığı yolaklar belirlenmiştir.

Serum örnekleri değerlendirilirken sağlıklı bireylerden alınan serumlardan elde edilen RNA’lar kontrol grubu olarak kullanılmış diğer tüm gruplar sağlıklıya göre analiz edilip anlatım farklılığı gösteren miRNA’lar tespit edilmiştir. Analiz sırasında doku örneklerinde olduğu gibi ikili gruplarda t-testi, ikiden fazla grup değerlendirmesinde F-testi uygulanarak anlamlı farklar tespit edilmiştir. İleri aşama olarak FC analizinden geçen miRNA’ların hedefledikleri genler tespit edilip o genlerin görev aldığı hedef yolaklar belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. ÖRNEKLERİN ÖZELLİKLERİ

Proje kapsamında uygun örneklerin belirlenmesi, kan ve doku alım işlemleri İstanbul Tıp Fakültesi Jinekolojik Onkoloji Anabilim Dalı'ndan ve Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında toplanan örnekler; sağlıklı bireylerden, primer epitelyal over kanser teşhisi konulmuş hastalardan, daha önce over kanser geçmişi olup tekrar nüks etmiş hastalardan ve basit over kisti bulunan hastalardan toplanmıştır. 2 deney (over kanseri ve nüks) ve 2 kontrol (basit over kisti ve sağlıklı) olmak üzere toplam 4 araştırma grubuyla çalışılmıştır. Sağlıklı grup hariç diğer araştırma gruplarından hem periferik kandan elde edilen serum hem de tümör (ya da kist) dokuları alınmıştır. Sağlıklı gruptan sadece serum alınmıştır. Alınan periferik kanlar ve dokular aynı gün soğuk zincir ile İ.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Tanı ve Analiz Birimi laboratuvarına transfer edilmiştir. Kanlar 10 ml kırmızı kapaklı tüplerde alınıp 1300 g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrılmıştır. Tümör ve kist dokularından yaklaşık 500 mg doku örneği, "RNA Later" stabilizasyon ve saklama solüsyonu içeren steril santrifüj tüplerinde alınarak izolasyon aşamasına kadar -80°C'de saklanmıştır. Bu çalışmada toplanan serum ve tümör veya kist dokularının hepsinden total RNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen RNA kalitesi en yüksek olan 8'er örnek ileriki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1:** Çalışmada kullanılan deney grupları.

Çalışma grubu	SERUM		DOKU	
	Örnek sayısı	Saklama Koşulları	Örnek sayısı	Saklama Koşulları
Sağlıklı bireyler (Kontrol grubu 1)	15	-80°C	-	-
Basit over kisti hastaları (Kontrol grubu 2)	8	-80°C	11	-80°C
Over kanseri hastaları	12	-80°C	12	-80°C
Nüks grubu	9	-80°C	13	-80°C

## 4.2. MOLEKÜLER ANALİZLER

### 4.2.1. Örneklerin Kalite Kontrolü

Serum ve doku örneklerinin ilk aşamadaki kalite kontrolü (quality control-QC) nanodrop kullanılarak yapılmıştır. Doku örneklerinin RNA kalitesi aynı zamanda biyoanalizörde de kontrol edilmiştir. Serum örneklerinin biyoanalizörde kontrol edilmemesinin nedeni çok az miktarda ve küçük RNA parçaları içermesidir. Bu nedenle biyoanalizörde kesin sonuç alınamamıştır.

Serumdan izole edilen RNA'ların kalitesini ve konsantrasyonunu ölçmek için "Thermo 2000c" nanodrop cihazı kullanılmıştır. Her bir örnekten 1,5 µl alınarak ölçüm yapılmış ve sonuçları kaydedilmiştir. Serumdan elde edilen serbest RNA konsantrasyonu çok az olduğu için 1.5-12 ng/µl aralığındaki konsantrasyon kullanılmıştır.

Tümör ve kist dokularından elde edilen total RNA'lar ise önce "Thermo 2000c" nanodrop cihazında ardından "Agilent Bioanalyzer 2100"de kontrol edilmiştir. Nanodrop uygulamasında "QIAGEN RNeasy Mini Kit"de bulunan "RNase free water" kör örnek olarak kullanılmış ve 1,5 µl örnekten alınarak ölçüm yapılmıştır. Ardından "RNA 6000 Nano Kit" ile biyoanalizörde değerlendirmeleri yapılmış ve "RNA Integrity Number" (RIN) a göre her grup için kalitesi en yüksek olan 8 örnek mikroarray çalışması için seçilmiştir. Şekil 4.1.'de yıkılmış, analiz edilemeyen ve kaliteli örneklerden birer tane gösterilmiştir. 40-45 arasındaki bant 18S ribosomal RNA'ya ve 45-50 arasındaki bant 28S ribosomal RNA'ya aittir. 18S ve 28S rRNA pikleri ne kadar belirgin ve kaliteliyse elde edilen total RNAnın kalitesi o kadar yüksek kabul edilir.

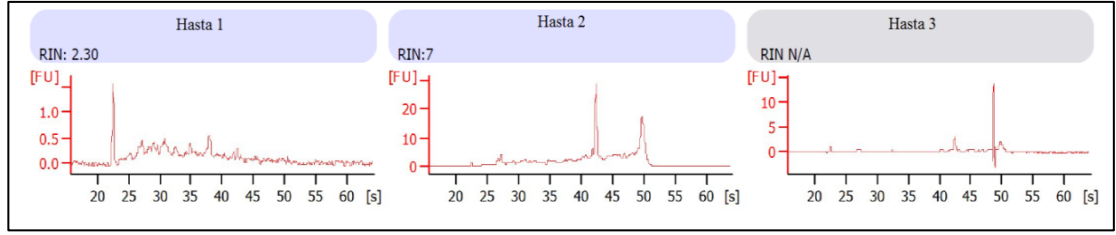
Tablo 4.2. ve tablo 4.3.'de tüm hastaların gruplandırılması, nanodrop ölçümünden elde edilen konsantrasyon (ng/µl),  $A_{260/280}$  oranı ve doku örnekleri için biyoanalizörün verdiği RIN değerleri gösterilmiştir. Konsantrasyonlar için 1.5-12 ng/µl aralığı;  $A_{260/280}$  için 1.5-2.4 aralığı; RIN değeri için 4.0-8.0 aralığı mikroarray için uygun olarak bulunmuştur. Bu özelliklere sahip örneklerden de değerleri en yüksek olan 8'er tanesi seçilmiştir.

**Tablo 4.2:** Over kanseri ve kist örneklerinin kalite kontrol sonuçları (\*Analiz edilemeyen).

OVER KANSERİ					KİST				
Hasta No	Serum		Doku		Hasta No	Serum		Doku	
	ng/μl	260/280	ng/μl	RIN		ng/μl	260/280	ng/μl	RIN
1	3.5	1.15	751.7	3.5	1	5.1	1.75	326.1	7
2	5.7	1.69	1045.3	6.5	2	11.6	1.69	670.2	7.8
3	6.4	1.33	544.1	4.9	3	14.4	1.55	20.9	6
4	31.9	1.58	1050.1	6.3	4	8.4	1.41	124.6	7
5	4.7	1.9	704.7	3.4	5	2.6	2.14	117.9	4
6	6.1	1.7	449.8	2.9	6	6.5	1.52	39	6.8
7	3.6	1.96	281	2.7	7	25.4	1.86		N/A*
8	5.5	1.5	376.9	3.7	8	4	1.36	257.8	6.7
9	3.9	1.48	984.8	6.7	9	3	1.75	257.8	6.7
10	5.1	2.08	1.7	N/A*	10	Elde edilemedi		2.5	N/A*
11	1.8	1.88		5.6	11	Elde edilemedi		35.3	N/A*
12	3.7	2.1	1052.1	6.7	12	Elde edilemedi			N/A*

**Tablo 4.3:** Nüks ve sağlıklı örneklerinin kalite kontrol sonuçları.

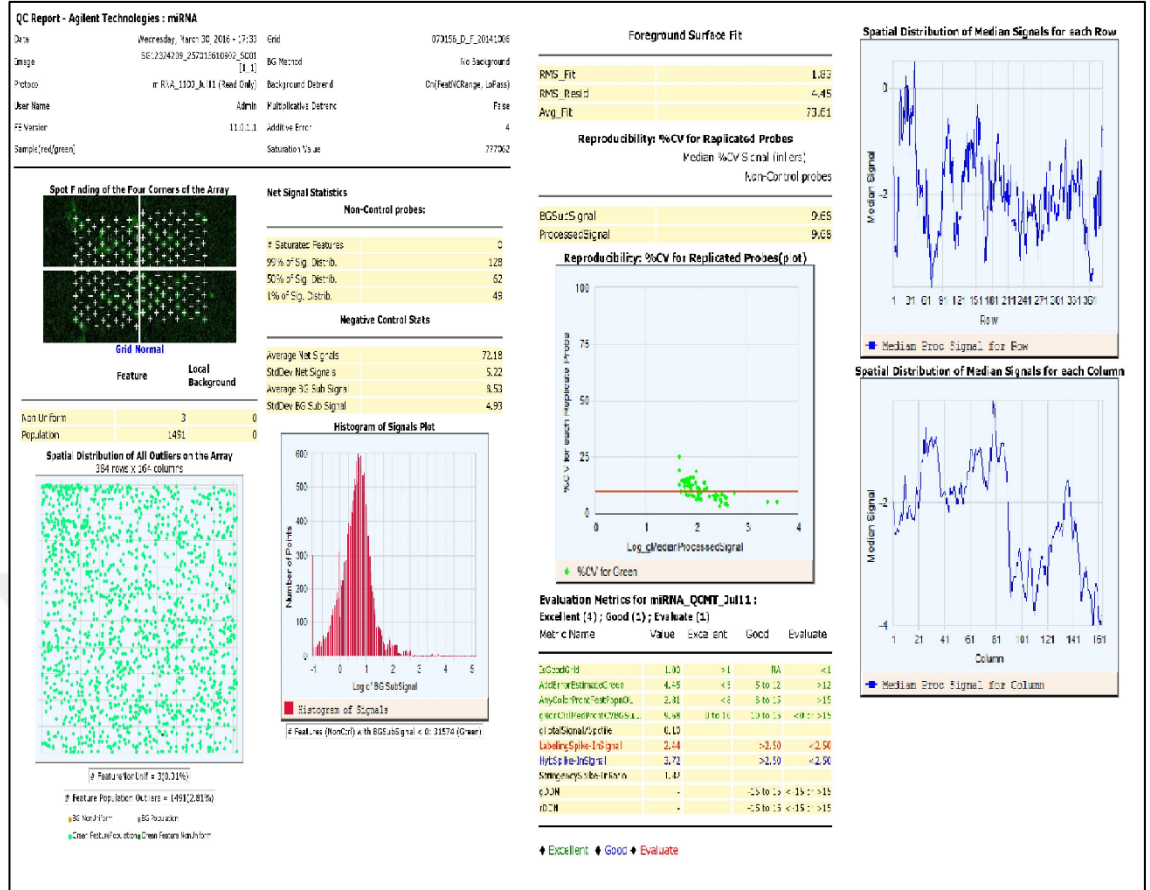
NÜKS					SAĞLIKLI		
Hasta No	Serum		Doku		Hasta No	Serum	
	ng/μl	260/280	ng/μl	RIN		ng/μl	260/280
1	6.7	1.66	1.1	2.4	1	12.3	1.67
2	3.4	1.88	21.9	7.2	2	15.8	1.5
3	3.1	2.38		4.5	3	3.3	1.61
4	12.7	1.76	556.6	2.40	4	2.8	1.53
5	7.1	1.49	134.8	5.30	5	5.8	1.7
6	3.7	2.01	566.5	8.40	6	31.9	1.57
7	6.1	1.62	34.9	7.3	7	12.6	1.49
8	64	2.03	81.7		8	4.4	1.63
9	4.5	1.47			9	61.8	1.53
10	Elde edilemedi		584.6		10	3.1	1.03
11	Elde edilemedi		15.3		11	2.4	1.86
12	Elde edilemedi		391.9		12	2.6	1.94
13	Elde edilemedi		194.4		13	4.2	1.49
					14	1.9	1.67
					15	3.3	1.69



**Şekil 4.1:** Doku örneklerinin biyoanalizör ile değerlendirilmesi. Hasta 1: Yıkılmış RNA örneği (RIN:2.30), Hasta 2: Kaliteli RNA örneği (RIN:7); Hasta 3: Değerlendirilemeyen RNA örneği (RIN N/A).

#### 4.2.2. MikroRNA Mikroarray Analizi ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Analize uygun bulunan tüm RNA'lar "Agilent SureScan Scanner" ile "AgilentG3\_miRNA" programı kullanılarak taranmıştır. Kullanılan çipler "Agilent SurePrint G3 Human miRNA r21 8x60K" isimli olup üzerlerinde 2549 insan miRNA'sını hedefleyen 60 nt'lik proplar sabitlenmiştir. İşaretleme ve hibridizasyon reaksiyonları için "*microRNA Spike-In kit*" (Agilent p/n 5190-1934) içerisindeki uygun solüsyonlar (sırasıyla İşaretleme Spike-In solüsyonu ve Hyb Spike-In solüsyonu) kullanılmıştır. Tarama sonucunda elde edilen ".tiff" uzantılı dosyalar "Agilent Feature Extraction v12.0"da değerlendirilmiş ve bir slaytta bulunan tüm kuyular için kalitatif ve kantitatif değerlendirmeler içeren ".pdf" dosyalarına dönüştürülmüştür. Şekil 4.2.'de elde edilen PDF dosyasının bir örneği gösterilmiştir. Hibridizasyonun, işaretlemenin, örneklerin ve yıkama aşamasının kalitesi bu dosyadan kontrol edilebilir. Bu çalışmada tüm slaytların analize uygun olarak hibridizasyon, işaretleme ve yıkama aşamasından geçtiği tespit edilmiştir.

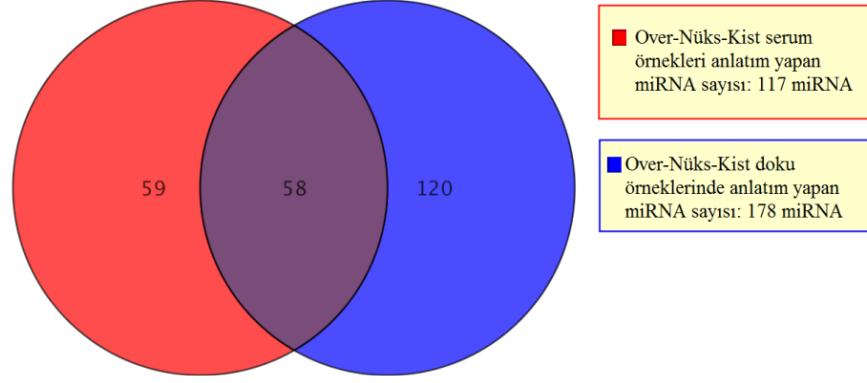


**Şekil 4.2:** “Agilent Feature Extraction v12.0” programından elde edilen QC raporu. Hibridizasyonun, işaretlemenin, örneklerin ve yıkama aşamalarının QC analizi.

QC değerlendirmesi yapılan text dosyaları esas değerlendirme programı olan “Agilent Gene Spring” biyoinformatik programında (Versiyon 12.6) değerlendirmeleri yapılmıştır. Doku örnekleri slaytları kendi aralarında, serum örnekleri slaytları kendi aralarında değerlendirilmiştir. Ortak bulunan miRNA’lar ise en son değerlendirme olarak incelenmiştir.

#### 4.2.2.1. Dokudan Elde Edilen miRNA’ların Analizi

Çalışmada nüks (N), over kanseri (O) ve basit over kisti (K) olmak üzere toplam 3 deney grubundan doku örneği alınmıştır. Basit over kisti örnekleri, doku miRNA’larını değerlendirmede kontrol olarak kullanılmıştır çünkü bu kitleler kanserleşme özelliği göstermeyen hücre topluluklarından alınmıştır. Yapılan analizlere göre dokuda 178 tane miRNA’nın üç grupta da anlamlı olduğu tespit edilmiş ve bunlardan 58 tanesinin aynı gruplara ait serum örneklerinde de anlamlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.3.).



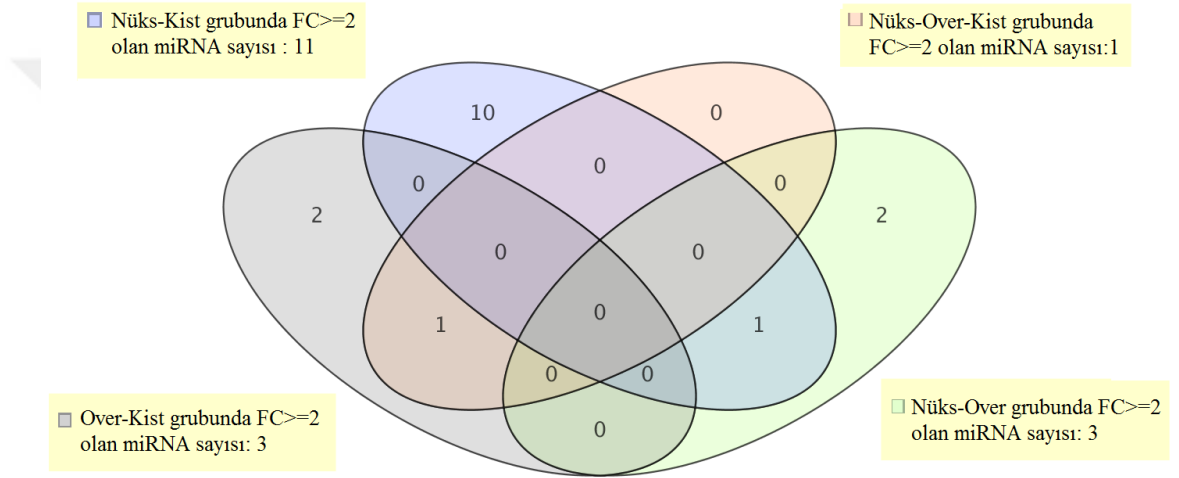
**Şekil 4.3:** Over kanseri, nüks etmiş ve basit over kisti doku ve serum örneklerinde anlatımı yapılmış miRNA sayısı.

Tüm gruplar önce ikişerli ardından üçü bir arada değerlendirilmiş ve ortak miRNA'lar ve yollar belirlenmiştir. İki grubu karşılaştırırken; önce istatistiksel analizlerinden “Multiple Testing Correction: Bonferroni FWER” (T test: corrected p-value cut-off >0.05) testini geçen ve anlatımı anlamlı değişen miRNA'lar belirlenmiştir. Ardından anlatım kat sayısı (fold change $\geq$ 2) (FC) 2 veya daha büyük olanlara göre ileri elemeler yapılmıştır. Üç grup değerlendirilirken ANOVA (“Analysis of Variation”) diğer ismiyle F testinin kullanılması istatistiksel açıdan daha doğru sonuç alınmasını sağlar. Bu testten geçen miRNA'ların anlatım katsayısı 2'den büyük olanlar değerlendirilmiştir. Bir sonraki aşamada o miRNA'ların hedefledikleri genler ve o genlerin rol oynadığı yollar belirlenmiştir. Tablo 4.4.'de gruplandırılan örneklerde anlatımı değişmiş ortak miRNA sayısı; Fold change $\geq$ 2 olan ortak miRNA sayısı ve ortak yolların sayısı gösterilmiştir. Ortak olan miRNA sayısı; FC testinden geçen miRNA'lar arasından referans miRNA'ların çıkarılmasıyla elde edilmiştir. Şekil 4.4.'de Fold change $\geq$ 2 olan miRNA'ların gruplandırılmasını ve şekil 4.5.'de ortak yolların sayısını gösteren venn şemaları verilmiştir.

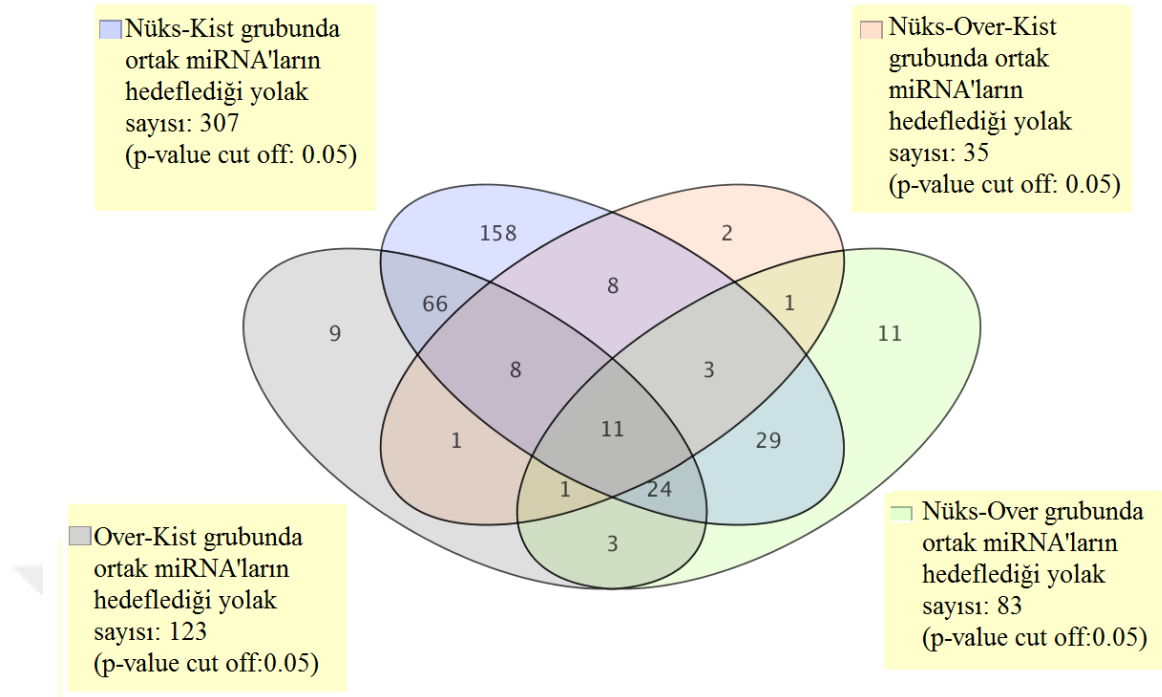


**Tablo 4.4:** Deney gruplarının beraber değerlendirilmesiyle elde edilen ortak olarak anlatımı değişen miRNA sayısı; Fold change  $\geq 2$  olan ortak miRNA, hedefledikleri gen sayısı ve genlerin yer aldığı yolların sayısı.

Gruplar	Kontrol grubuna göre anlatımı değişen miRNA sayısı	Fold change $\geq 2.0$ olan miRNA sayısı	Hedeflenen gen sayısı	Hedeflenmiş genlerin yer aldığı yolların sayısı
O-N	1	3	121	83
O-K	3	3	155	123
N-K	10	11	738	307
O-K-N	1	1	48	35



**Şekil 4.4:** Fold change  $\geq 2$  olan anlatımı değişmiş miRNA'ların gruplandırılması.



**Şekil 4.5:** Gruplar arasında ortak yolakların sayısını gösteren venn şemaları.

**Nüks grubu ile basit over kisti** grubunun karşılaştırılması sonucunda dokuda 158; serumda 105 tane anlatım yapan miRNA tespit edilmiş ve 46 tanesinin her iki grupta da anlatım yaptığı bulunmuştur. T-testten geçen 16 tane anlatımı anlamlı değişmiş miRNA'dan (Tablo 4.5.) 11 tanesinin FC değerinin 2'nin üstünde olduğu tespit edilmiştir. 11 miRNA'nın bir tanesi referans miRNA olduğu için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Sonuç olarak 8 tane anlatımı azalmış (down-regüle olmuş) ve 2 tane anlatımı artmış (up-regüle olmuş) miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların toplam olarak hedeflediği gen sayısı 738 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 307 olarak bulunmuştur. Gastrik kanser, pankreatik kanser, prostat kanseri, meme kanseri yolakları ve apoptoz, apoptoz kontrolü mekanizmaları hedeflenen yolaklardan bazılarıdır.

**Tablo 4.5:** Nüks-Kist gruplarının (t-test corrected p-value cut-off >0.05) değerlendirilmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA'lar, p-değerleri, regülasyonu, FC değeri, kromozom ve aktif dizisi. (~ ile işaretli olanlar FC≥2 olan miRNA'lar).

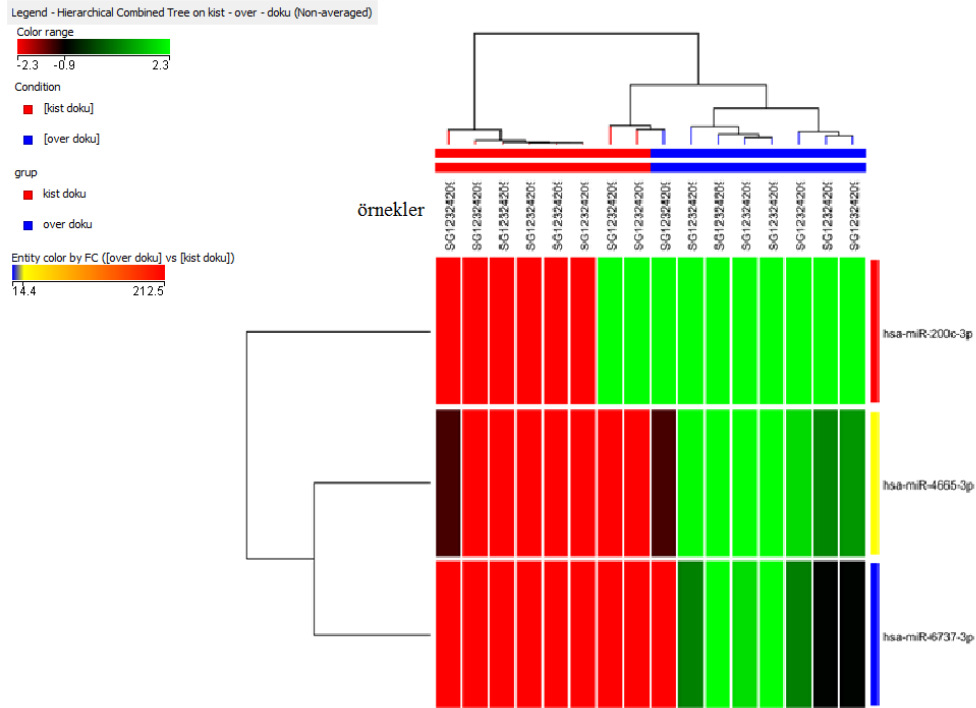
miRNA'nın sistematik ismi	p-değeri	Regülasyonu	FC	Log FC	Aktif dizisi	Kromozom
dmr_6	0.0325841	azalmış	- 2.27245	- 1.18425	REFERANS	
hsa-let-7b-5p~	0.0167271	azalmış	- 3.26113	- 1.70537	AACCACACAACCTACTA CC	chr22
hsa-let-7c-5p~	0.0314587	azalmış	-4.0441	- 2.01582	AACCATACAACCTACTA CC	chr21
hsa-miR-125b-5p~	0.0294052	azalmış	- 5.05902	- 2.33886	TCACAAGTTAGGGTCTC	chr11
hsa-miR-1268a	0.0248887	artmış	1.38097 7	0.46569	CCCCACCACCAC	chr15
hsa-miR-145-5p~	0.0236143	azalmış	-10.017	- 3.32438	AGGGATTCCTGGGAAA AC	chr5
hsa-miR-320a~	0.0493588	azalmış	- 2.18585	-1.1282	TCGCCCTCTCAAC	chr8
hsa-miR-320b~	0.038191	azalmış	- 2.60063	- 1.37886	TTGCCCTCTCAACCC	
hsa-miR-320d~	0.04268	azalmış	- 3.19419	- 1.67545	TCCTCTCAACCCAGC	
hsa-miR-320e~	0.033962	azalmış	- 3.34318	- 1.74122	CCTTCTCAACCCAGC	
hsa-miR-3960	0.001373	artmış	1.49204 2	0.57728 8	CCCCGCCTCCG	
hsa-miR-4270	0.0493746	artmış	1.60935	0.68647 8	GCCCTCCCCTGAC	
hsa-miR-6087~	0.035676	artmış	2.13222 3	1.09235 9	GCTCGCCCCCCC	
hsa-miR-6090	0.0064338	artmış	1.44349 5	0.52956 6	GCCCCGCCCT	
hsa-miR-6125	0.0141092	artmış	1.71152 9	0.77528 6	TCCGCCGCTCCG	
hsa-miR-6791-5p	0.0146538	artmış	1.50013 6	0.58509 3	TCCGCCTGCCAG	
hsa-miR-937-5p~	0.0040447	artmış	2.47871 9	1.30959 5	CCAGCCCCACCC	

**Over kanseri grubu ile basit over kisti grubu doku örneklerinde toplam 162 miRNA ve serum örneklerinde 79 miRNA'nın anlatım yaptığı, bunların 47'sinin ortak olduğu tespit edilmiştir. İki grubun karşılaştırılması sonucunda t-testten geçen 3 tane anlatımı anlamlı değişmiş miRNA bulunmuş (Tablo 4.6.) ve bunlardan 3'nün de FC değerinin 2'nin üstünde olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak 3 miRNA'nın da anlatımının arttığı (up-regüle) tespit edilmiştir. hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-6737-3p anlatım farkı olan miRNA'ların "heat-map" görüntüsü ile hangi örnekte hangi oranda**

değiştikleri gösterilmiştir (Şekil 4.6.). Bu miRNA'ların toplam olarak hedeflediği gen sayısı 155 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 123 olarak bulunmuştur. Gastrik kanser, prostat kanseri, meme kanseri yolakları ve apoptoz, apoptoz kontrolü, yaşlanma, otofaji mekanizmaları hedeflenen yolaklardan bazılarıdır.

**Tablo 4.6:** Over-Kist gruplarının (t-test corrected p-value cut-off >0.05) değerlendirilmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA'lar, p-değerleri, regülasyonu, FC değeri, kromozom ve aktif dizisi. (~ile işaretli olanlar FC≥2 olan miRNA'lar).

miRNA'nın sistematik ismi	p-değeri	Regülasyonu	FC	Log FC	Aktif Dizisi	Kromozom
hsa-miR-200c-3p~	0.000096 5	artmış	234.491 5	7.87339 2	TCCATCATTACCCG G	chr12
hsa-miR-4665-3p~	0.000001 1	artmış	29.0310 3	4.85952 4	GGCGGGGGCTAC	
hsa-miR-6737-3p~	0.000060 2	artmış	14.4347 7	3.85147 6	CTGGGTAGGGGTG A	



**Şekil 4.6:** hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-6737-3p anlatım farkı olan miRNA'ların "heat-map" görüntüsü.

**Nüks grubu ile over kanseri grubunun karşılaştırılması** sonucunda dokuda 169; serumda 114 tane anlatım yapan miRNA tespit edilmiş ve 55 tanesinin her iki grupta da

anlatım yaptığı bulunmuştur. T-testten geçen 3 tane anlatımı anlamlı değişmiş miRNA'dan (Tablo 4.7.) 2 tanesinin FC değeri 2'nin üstünde olduğu tespit edilmiştir fakat referans miRNA'ları oldukları için değerlendirmeye alınmamıştır. Geriye kalan bir miRNA'nın artış katsayısı 1.9 olarak bulunmuştur ve anlatımı azalmıştır. Bu miRNA'nın toplam olarak hedeflediği gen sayısı 121 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 83 olarak bulunmuştur. Pankreatik kanser, prostat kanseri, meme kanseri yolları hedeflenen yollardan bazılarıdır.

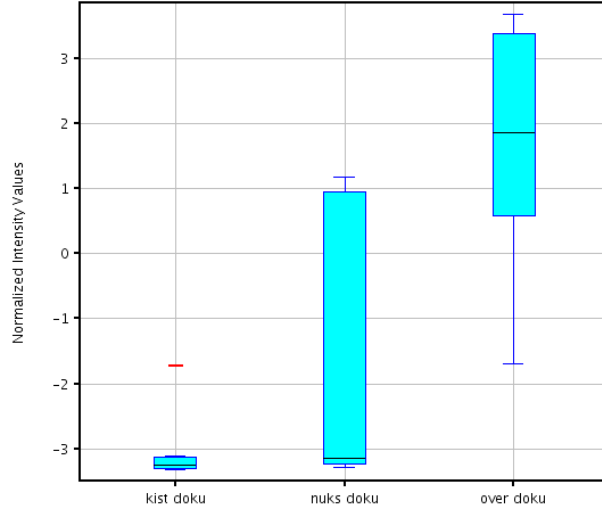
**Tablo 4.7:** Nüks-over gruplarının (t-test corrected p-value cut-off >0.05) değerlendirmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA'lar, p-değerleri, regülasyonu, FC değeri, aktif dizisi.

miRNA'nın sitematik ismi	p (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
dmr_3	0.016729	Artmış	3.072326	1.619331	REFERANS
dmr_6	0.011074	Artmış	5.687037	2.507677	REFERANS
hsa-miR-3656	0.016729	Azalmış	-1.85848	-0.89412	CCACCCCCGCAC

**Nüks grubu, over kanseri ve basit over kisti** gruplarının karşılaştırılması sonucunda dokuda 178; serumda 117 tane anlatım yapan miRNA tespit edilmiş ve 58 tanesinin her iki grupta da anlatım yaptığı bulunmuştur. Bu gruba uygulanan ANOVA testinden geçen 1 tane (hsa-miR-4665-3p) anlatımı anlamlı değişmiş miRNA'nın (Tablo 4.8.) FC değerinin 2'nin üstünde olduğu tespit edilmiş ve anlatımının azaldığı bulunmuştur. hsa-miR-4665-3p'ün up regüle olduğu "box-whisker" denilen analiz görüntüleme yöntemiyle gösterilmiştir (Şekil 4.7.). Bu miRNA'nın hedeflediği gen sayısı 48 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 35 olarak bulunmuştur. Apoptoz, sinyalleşme, ovarian infertilite, DNA hasarı, hücre siklusu kontrolü gibi yollarda etkili olan genleri etkilediği görülmüştür.

**Tablo 4.8:** Nüks-Over-Kist gruplarının (ANOVA testi corrected p-value cut-off >0.05) değerlendirmesi sonucu anlatımı anlamlı olarak değişmiş miRNA, p-değeri, regülasyonu, FC değeri, aktif dizisi.

miRNA'nın sitematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
hsa-miR-4665-3p	0.003239	Artmış	2.370603	1.245254	GGCGGGGGCTAC



**Şekil 4.7:** hsa-miR-4665-3p'ün up regüle olduğu gösterilen “box-whisker” görüntüsü.

#### 4.2.2.2. *Serumdan Elde Edilen miRNA'ların Analizi*

Over kanseri (O), basit over kisti (K), nüks (N) ve sağlıklı (S) olmak üzere toplam 4 gruptan serum örnekleri toplanmıştır. Doku örneklerinde yapılan analizler bu örneklere de uygulanmıştır. “Agilent SureScan Scanner” ile “AgilentG3\_miRNA” programı kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan çipler “Agilent SurePrint G3 Human miRNA r21 8x60K” isimli olup üzerlerinde 2549 insan miRNA'sını hedefleyen 60 nt'lik problr sabitlenmiştir. İşaretleme ve hibridizasyon reaksiyonları için “*microRNA Spike-In kit*” (Agilent p/n 5190-1934) içerisindeki uygun solüsyonlar (sırasıyla İşaretleme Spike-In solüsyonu ve Hyb Spike-In solüsyonu) kullanılmıştır. Tarama sonucunda elde edilen “.tiff” uzantılı dosyalar “Agilent Feature Extraction v12.0”da değerlendirilmiş ve bir slaytta bulunan tüm kuyular için kalitatif ve kantitatif değerlendirmeler içeren “.pdf” dosyalarına dönüştürülmüştür. Hibridizasyonun, işaretlemenin, örneklerin ve yıkama aşamasının kalitesi bu dosyadan kontrol edilebilir. Bu çalışmada tüm slaytların analize uygun olarak hibridizasyon, işaretleme ve yıkama aşamasından geçtiği tespit edilmiştir.

Doku örneklerinde olduğu gibi gruplar birbiriyle karşılaştırılırken, ikili gruplarda önce t-test uygulanmış ardından elde edilen miRNA'ların FC oranlarına göre ileri elemeler yapılmıştır. İstatiksel değerlendirmelerde FC 2'den ne kadar fazla olursa miRNA'nın anlatımındaki değişim o kadar anlamlıdır denilebilir. T-testten geçen fakat FC oranı 2'den düşük olan miRNA'ların analizi de kanserle ilişkisine göre yapılır. Anlatım oranı

değişen miRNA'lar tespit edildikten sonra hedefledikleri genler ve genlerin rol oynadığı yollar belirlenir. Üç ve daha fazla grup değerlendirilirken ANOVA (Analysis of Variation) diğer ismiyle F testinin kullanılması istatistiksel açıdan daha doğru sonuç alınmasını sağlar. Bu testten geçen miRNA'ların anlatım katsayısı 2'den büyük olanlar değerlendirilmiştir. Bir sonraki aşamada o miRNA'ların hedefledikleri genler ve o genlerin rol oynadığı yollar belirlenmiştir. Serum örneklerinde karşılaştırma yapılan gruplar çok çeşitli olup her karşılaştırmada farklı miRNA'lar elde edilmiştir. Tablo 4.9.'da karşılaştırılan gruplar, gruplardan elde edilen anlatımı değişmiş miRNA sayısı, o miRNA'ların hedefledikleri gen sayısı ve genlerin rol oynadığı yolların sayısı gösterilmiştir.

**Tablo 4.9:** Serum örnekleri grupları arasında anlatımı değişen miRNA sayısı, bu miRNA'lardan  $FC \geq 2$  olanların sayısı, hedefledikleri gen sayısı, genlerin yer aldığı yolların sayısı.

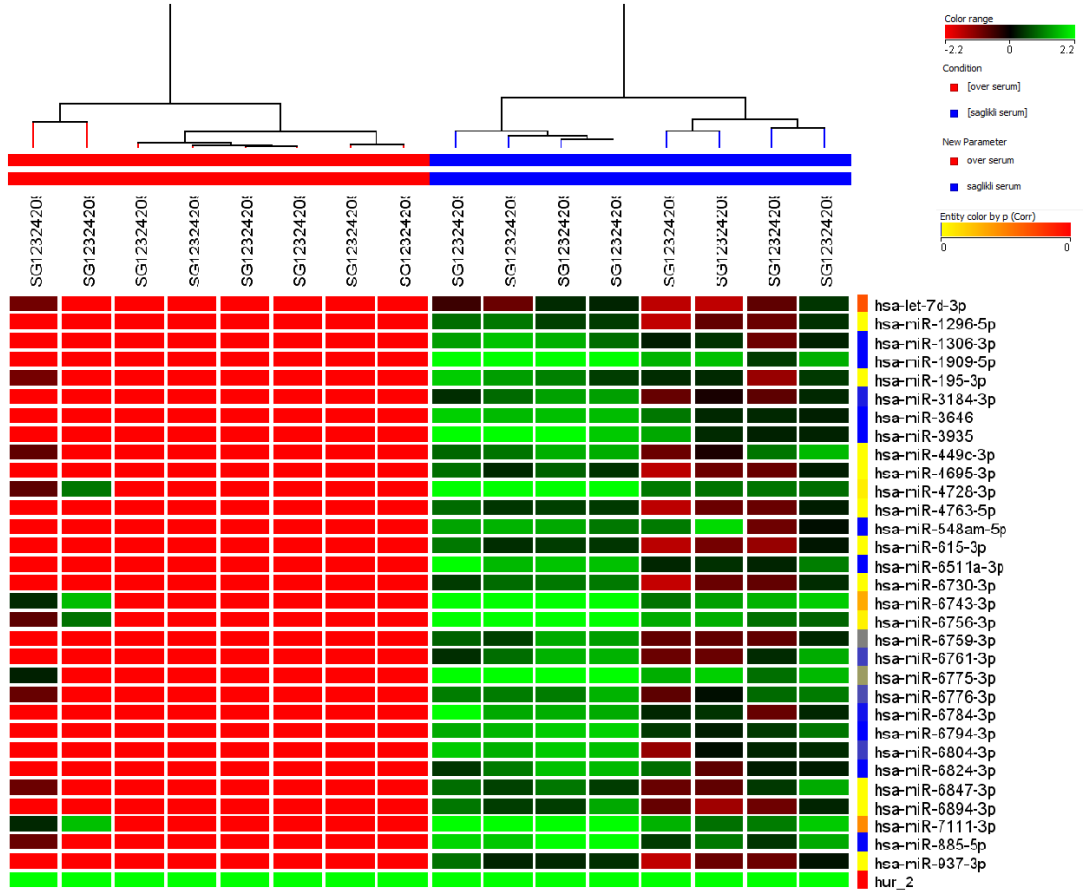
Gruplar	Kontrol grubuna göre anlatımı değişen miRNA sayısı	$FC \geq 2$ olan miRNA sayısı	Hedeflenen gen sayısı	Hedeflenmiş genlerin yer aldığı yolların sayısı
O-S	31	31	54	41
O-K	15	15	301	174
O-N	2	2	426	236
K-N	11	11	314	178
K-S	17	17		
N-S	2	2		
O-N-S	21	6 ( $p < 0.005$ )	492	232
O-N-K	6	6	238	150
O-N-K-S	2	2	121	83

**Over kanseri-sağlıklı** serum örnekleri karşılaştırıldığında t-test sonucunda 32 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. Birtanesi referans miRNA olduğu için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Sonuç olarak tüm miRNA'ların anlatımının düşmüş (down-regüle olmuş) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10). Bu miRNA'ların hedeflediği gen sayısı 54 olup genlerin hedeflediği yolların sayısı 41 olarak bulunmuştur. Bu yolların arasında hücre döngüsü, DNA replikasyonu, sinyalleşme gibi kanser oluşumunda önemli olan yollar bulunmaktadır. Şekil 4.8.'de anlatımı değişen miRNA'ların over kanseri ile sağlıklı grubunun örneklerinde değişim oranını gösteren hiyerarşik şema görüntüsü verilmiştir.

**Tablo 4.10:** Over kanseri ile sağlıklı örnekler arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sitematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
hsa-let-7d-3p	0.007216325	Azalmış	-4.20571	-2.07235	AGAAAGGCAGCAGGTCG T
hsa-miR-1296-5p	6.10E-05	Azalmış	-7.47779	-2.90261	GGAGATGGAGCCAGG
hsa-miR-1306-3p	5.66E-07	Azalmış	-12.0578	-3.59189	CACCACCAGAGCCA
hsa-miR-1909-5p	2.84E-09	Azalmış	-29.5675	-4.88594	CAGGGCAGGCACC
hsa-miR-195-3p	6.82E-05	Azalmış	-9.29822	-3.21695	GGAGCAGCACAGCCA
hsa-miR-3184-3p	3.69E-06	Azalmış	-9.28241	-3.2145	TGAGGGGCAGAGAGC
hsa-miR-3646	3.56E-09	Azalmış	-15.8342	-3.98497	TGGGCTGGGCTCA
hsa-miR-3935	1.11E-07	Azalmış	-19.3849	-4.27686	GTGGCTGGTGCTCG
hsa-miR-449c-3p	4.39E-05	Azalmış	-10.5968	-3.40556	ACAGAGAGGAGTGCAAC
hsa-miR-4695-3p	4.30E-05	Azalmış	-7.0671	-2.82112	GAAGGAGGCAGCGG
hsa-miR-4728-3p	7.51E-04	Azalmış	-13.8337	-3.79012	CTGGGGCAGGAGG
hsa-miR-4763-5p	3.10E-05	Azalmış	-6.9577	-2.79861	AGCAGGAGGGCTGG
hsa-miR-548am-5p	4.92E-07	Azalmış	-14.3953	-3.84752	GGCAAAAACCGCAATTAC TTTT
hsa-miR-615-3p	1.08E-04	Azalmış	-6.63555	-2.73022	AAGAGGGAGACCCAGGC
hsa-miR-6511a-3p	3.25E-08	Azalmış	-17.2683	-4.11005	GCAGGCAGAAGGGA
hsa-miR-6730-3p	9.03E-05	Azalmış	-7.7583	-2.95574	TGAGGGCAGATGGGG
hsa-miR-6743-3p	0.00354032	Azalmış	-15.3765	-3.94265	TGTGGGCAGGGAGA
hsa-miR-6756-3p	6.04E-04	Azalmış	-16.7388	-4.06512	CTGGGCAGGGAGG
hsa-miR-6759-3p	1.58E-05	Azalmış	-8.90984	-3.1554	CTGAGGGGAGAGGC
hsa-miR-6761-3p	7.93E-06	Azalmış	-10.9532	-3.45328	GGAGTGAGAGAGCAGC
hsa-miR-6775-3p	1.93E-05	Azalmış	-25.393	-4.66636	CTGGGGCAGAGGAC
hsa-miR-6776-3p	9.53E-06	Azalmış	-10.3776	-3.3754	CTGGGGAGAGACAGT
hsa-miR-6784-3p	2.33E-06	Azalmış	-13.7505	-3.78141	CTGGGGCAGAGTTGG
hsa-miR-6794-3p	1.32E-09	Azalmış	-16.1436	-4.01289	AGGGAGGGACTGAGA
hsa-miR-6804-3p	7.80E-06	Azalmış	-12.7672	-3.67437	CTGTGGGTGAGAGGC
hsa-miR-6824-3p	2.59E-07	Azalmış	-11.927	-3.57616	CTGGGGTGGCAAGA
hsa-miR-6847-3p	9.39E-05	Azalmış	-8.1791	-3.03194	GAAGAGGACAGACACA
hsa-miR-6894-3p	5.72E-05	Azalmış	-7.89476	-2.9809	CTGGAGGAAGAGGGC
hsa-miR-7111-3p	0.004895594	Azalmış	-14.0954	-3.81715	CTGGGAGGAGGGA
hsa-miR-885-5p	5.21E-07	Azalmış	-16.7159	-4.06315	AGAGGCAGGGTAGTGTA
hsa-miR-937-3p	3.21E-05	Azalmış	-6.65252	-2.7339	GGCAGAGAGTCAGAGC
hur_2	0.011801108	Azalmış	-5.89446	-2.55936	REFERANS



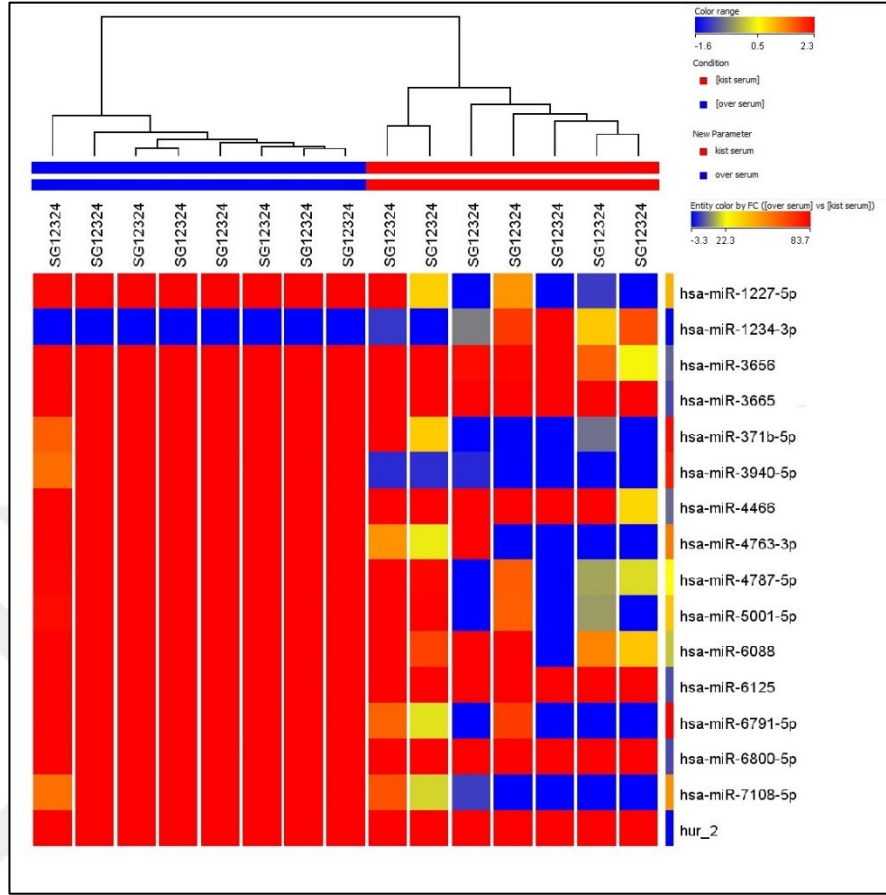


**Şekil 4.8:** Anlatımı değişen miRNA'ların over kanseri ile sağlıklı serum grubunun örneklerinde değişim oranını gösteren hiyerarşik şema görüntüsü.

**Over kanseri-kist serum örnekleri karşılaştırıldığında t-test sonucunda 16 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur.** MiRNA'lardan biri referans miRNA olduğu için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Sonuç olarak 1 miRNA'nın anlatımı azalırken geriye kalan miRNA'ların anlatımının arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.11). Bu miRNA'nın hedeflediği gen sayısı 301 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 174 olarak bulunmuştur. Bu yolakların arasında hücre döngüsü, DNA replikasyonu, sinyalleşme gibi kanser oluşumunda önemli olan yolaklar ve meme kanseri, prostat kanseri gibi kanserlerle ilişkili yolaklar da bulunmaktadır.

**Tablo 4.11:** Over kanseri ile basit over kisti örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sitematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
hsa-miR-1227-5p	0.008193065	Artmış	40.85899	5.352582	CCACCGCCTGGC
hsa-miR-1234-3p	0.011811372	Azalmış	-14.2088	-3.82871	GTGGGGTGGGT
hsa-miR-3656	0.02695937	Artmış	6.59468	2.721303	CCACCCCCGCAC
hsa-miR-3665	8.29E-04	Artmış	4.0575	2.020591	CGCCGCCCG
hsa-miR-371b-5p	9.02E-04	Artmış	82.12779	6.359798	AAAGTGCCGCCATCT
hsa-miR-3940-5p	4.45E-07	Artmış	77.13776	6.269365	CAGAGCCCGCCC
hsa-miR-4466	0.018990463	Artmış	7.351152	2.877971	CCCCGCCGCC
hsa-miR-4763-3p	0.01287978	Artmış	53.7241	5.747498	CCGCCCAGCAC
hsa-miR-4787-5p	0.016299551	Artmış	22.25769	4.476232	GGGATGCCGCCG
hsa-miR-5001-5p	0.030262966	Artmış	35.93712	5.167403	AGCTCCGCCGCTG
hsa-miR-6088	0.030267222	Artmış	16.65675	4.058035	CGCCCCCGC
hsa-miR-6125	1.53E-04	Artmış	4.688584	2.229152	TCCGCCGCTCCG
hsa-miR-6791-5p	5.30E-05	Artmış	94.61427	6.563986	TCCGCCTGCCCAG
hsa-miR-6800-5p	6.03E-04	Artmış	4.063304	2.022653	CCGCCCTGACTG
hsa-miR-7108-5p	3.20E-04	Artmış	49.24804	5.621995	CCACCGCCTGC
hur_2	0.002327854	Azalmış	-9.3375	-3.22304	REFERANS



**Şekil 4.9:** Anlatımı değişen miRNA'ların over kanseri ile kist grubunun örneklerinde değişim oranını gösteren hiyerarşik şema görüntüsü.

**Over kanseri-nüks** serum örnekleri karşılaştırıldığında t-test sonucunda 5 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. MiRNA'lardan 3 tanesi referans miRNA olduğu için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Sonuç olarak 2 miRNA'nın anlatımının arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.12). Bu miRNA'ların hedeflediği gen sayısı 426 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 236 olarak bulunmuştur. Bu yolakların arasında hücre döngüsü, DNA replikasyonu, sinyalleşme, apoptoz gibi kanser oluşumunda önemli olan yolaklar ve meme kanseri, prostat kanseri gibi kanserlerle ilişkili yolaklar da bulunmaktadır.

**Tablo 4.12:** Over kanseri ile nüks serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sitematik ismi	p değeri	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
dmr_285	0.00232	Azalmış	-9.64435	-3.26968	REFERANS
dmr_31a	0.00019	Azalmış	-18.1994	-4.18582	REFERANS
hsa-miR-4701-5p	0.00852	Artmış	7.044024	2.8164	AAGGGGTAGGTG TGTT
hsa-miR-6775-3p	0.00094	Artmış	10.98402	3.457334	CTGGGGCAGAGG AC
miRNABrightCorner30	0.00487	Artmış	244.424	7.933242	REFERANS

**Kist-nüks** serum örnekleri karşılaştırıldığında t-test sonucunda 11 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. MiRNA'lardan 2 tanesi referans miRNA olduğu için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Anlatımı değişen tüm miRNA'ların FC değerinin 2'nin üstünde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 10 miRNA'nın anlatımının arttığı bir miRNA'nın ise anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.13). Bu miRNA'ların hedeflediği gen sayısı 314 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 178 olarak bulunmuştur. Bu yolakların arasında hücre döngüsü, DNA replikasyonu, sinyalleşme, apoptoz gibi kanser oluşumunda önemli olan yolaklar ve meme kanseri, prostat kanseri gibi kanserlerle ilişkili yolaklar da bulunmaktadır.

**Tablo 4.13:** Basit over kisti ile nüks serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sitematik ismi	p değeri	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
dmr_31a	0.018216	Azalmış	-6.25308	-2.64457	REFERANS
hsa-miR-1207-5p	0.0196457	Artmış	18.13769	4.180919	CCCCTCCAGCCT
hsa-miR-1273g-3p	0.013275	Azalmış	-4.36282	-2.12526	CTCAGGCTGGAGTGC
hsa-miR-4281	0.0435449	Artmış	2.541699	1.345793	CCCCCTCCCCG
hsa-miR-4507	0.042519	Artmış	11.86221	3.568301	CCCAGCCCAGCC
hsa-miR-4787-5p	0.0168184	Artmış	10.42983	3.382643	GGGATGCCGCCG
hsa-miR-5001-5p	0.0136276	Artmış	18.38823	4.200711	AGCTCCGCCGCTG
hsa-miR-6088	0.0435011	Artmış	6.845624	2.775182	CGCCCCCCGC
hsa-miR-6089	0.0317957	Artmış	2.966806	1.568911	CCGCCCCGCC
hsa-miR-6090	0.0044856	Artmış	3.663523	1.873232	GCCCCGCCCT
hsa-miR-6125	0.0463378	Artmış	2.048466	1.034544	TCCGCCGCTCCG
hsa-miR-7107-5p	0.011251	Artmış	14.55014	3.862961	CCCTTCTCTCCC
hur_2	0.0073629	Azalmış	-3.50076	-1.80767	REFERANS

**Kist ve sağlıklı** serum örnekleri karşılaştırıldığında t-test sonucunda 17 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. Anlatımı değişen tüm miRNA'ların FC değerinin 2'nin üstünde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 17 miRNA'nın da anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.14).

**Tablo 4.14:** Basit over kisti ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sistematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
hsa-miR-328-5p	0.00811225	Azalmış	-69.7327	-6.12376	CCCTGAGCCCCTC
hsa-miR-3656	0.01682538	Azalmış	-4.45016	-2.15386	CCACCCCGCAC
hsa-miR-3665	0.04205622	Azalmış	-2.6323	-1.39632	CGCCGCCCG
hsa-miR-371b-5p	0.028327262	Azalmış	-73.3036	-6.19581	AAAGTGCCGCCATCT
hsa-miR-3940-5p	0.002154241	Azalmış	-54.4941	-5.76803	CAGAGCCCGCCC
hsa-miR-4433a-3p	5.31E-04	Azalmış	-42.7638	-5.41832	ATGTCCCACCCCA
hsa-miR-4485-5p	9.11E-07	Azalmış	-31.2701	-4.96671	TCACTGGGCAGGCG
hsa-miR-4707-5p	0.009225269	Azalmış	-22.4053	-4.48577	CCAGAACCCGCC
hsa-miR-548am-5p	0.019858273	Azalmış	-17.9719	-4.16767	GGCAAAAACCGCAATTA CTTTT
hsa-miR-6125	0.017486379	Azalmış	-2.70151	-1.43377	TCCGCCGCTCCG
hsa-miR-6775-5p	0.047819756	Azalmış	-16.3294	-4.0294	CCAGCCTCCCTCC
hsa-miR-6800-5p	0.0192896	Azalmış	-2.84907	-1.51049	CCGCCCTGACTG
hsa-miR-6821-5p	0.036967877	Azalmış	-3.77561	-1.91671	CCCCGCCTCGAG
hsa-miR-6891-5p	0.04224441	Azalmış	-36.9163	-5.20619	CCCCTCATCCCC
hsa-miR-7108-5p	0.022520898	Azalmış	-55.5543	-5.79583	CCACCCGCCTGC
hsa-miR-762	0.001841374	Azalmış	-26.2765	-4.7157	GCTCGGCCCGG
hsa-miR-7845-5p	0.001121922	Azalmış	-13.7174	-3.77794	CCACGACCCTCCC

**Nüks ve sağlıklı** serum örnekleri karşılaştırıldığında t-test sonucunda 2 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. Anlatımı değişen tüm miRNA'ların FC değerinin 2'nin üstünde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 2 miRNA'nın da anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.15).

**Tablo 4.15:** Nüks ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sistematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
hsa-miR-1273g-3p	0.03302524	Azalmış	-2.65121	-1.40665	CTCAGGCTGGAGTGC
hsa-miR-4485-5p	0.00160227	Azalmış	-42.0672	-5.39462	TCACTGGGCAGGCCG

**Over-nüks-sağlıklı** serum örnekleri karşılaştırıldığında ANOVA sonucunda 22 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. MiRNA'lardan 1 tanesi referans miRNA olduğu için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Anlatımı değişen tüm miRNA'ların FC değerinin 2'nin üstünde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 22 miRNA'nın da anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.16). Bu miRNA'ların 180 geni hedeflediği ve bu genlerin görev aldıkları yolak sayısı 100 olarak tespit edilmiştir.

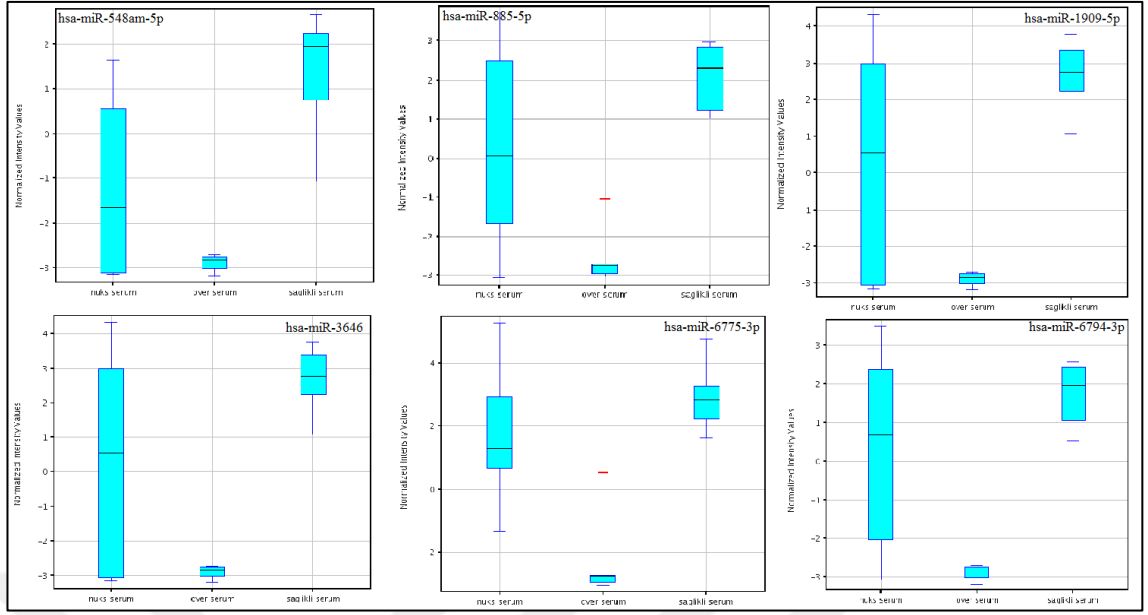
Bu grupta bir ileri eleme daha yapıp bu 22 miRNA'nın içinden p değeri 0.005'in altında olan miRNA'lar değerlendirilmiş ve 6 miRNA bulunmuştur (tablo 4.16). Bu miRNA'ların hedeflediği gen sayısı 492 olup genlerin hedeflediği yolak sayısı 232 olarak bulunmuştur. Bu yolakların arasında hücre döngüsü, DNA replikasyonu, sinyalleşme, apoptoz gibi kanser oluşumunda önemli olan yolaklar ve meme kanseri, prostat kanseri gibi kanserlerle ilişkili yolaklar da bulunmaktadır. 6 miRNA'nın anlatım oranlarının gösterildiği "box-whisker" görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.

**Tablo 4.16:** Over kanseri-Nüks ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi (~ p<0.005 ve FC>=2 olan miRNA'lar).

miRNA'nın sistematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
dmr_31a	0.0152	Azalmış	5.2774	2.3998	
hsa-miR-1306-3p	0.0128	Azalmış	-16.2962	4.0265	CACCACCAGAGCCA
hsa-miR-1909-5p~	0.0021	Azalmış	47.7414	5.5772	CAGGGCAGGCACC
hsa-miR-195-3p	0.0266	Azalmış	13.0282	3.7036	GGAGCAGCACAGCCA
hsa-miR-3646~	0.0023	Azalmış	23.1911	4.5355	TGGGCTGGGCTCA
hsa-miR-3935	0.0083	Azalmış	28.0398	4.8094	GTGGCTGGTGCTCG
hsa-miR-4728-3p	0.0076	Azalmış	20.6800	4.3702	CTGGGGCAGGAGG

**Tablo 4.17 (devam):** Over kanseri-Nüks ile sağlıklı serum örnekleri arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi (~ p<0.005 ve FC>=2 olan miRNA'lar).

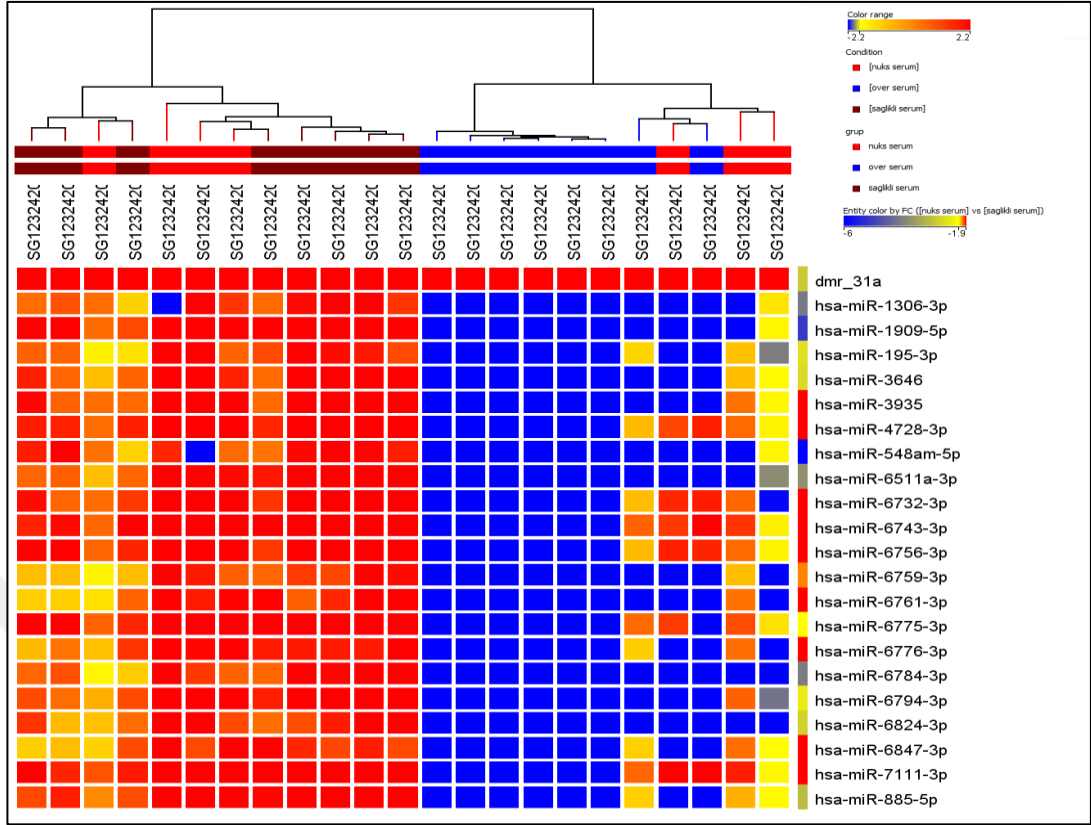
hsa-miR-548am-5p~	0.0015	Azalmış	- 21.1004	- 4.3992	GGCAAAAACCGCAATTACTT TT
hsa-miR-6511a-3p	0.0099	Azalmış	- 25.3976	- 4.6666	GCAGGCAGAAGGGA
hsa-miR-6732-3p	0.0247	Azalmış	- 16.4746	- 4.0422	CTGGGAGGGAGAGG
hsa-miR-6743-3p	0.0341	Azalmış	- 22.9775	- 4.5221	TGTGGGCAGGGAGA
hsa-miR-6756-3p	0.0081	Azalmış	- 24.4476	- 4.6116	CTGGGCAGGGAGG
hsa-miR-6759-3p	0.0274	Azalmış	- 11.4661	- 3.5193	CTGAGGGGAGAGGC
hsa-miR-6761-3p	0.0437	Azalmış	- 14.2962	- 3.8376	GGAGTGAGAGAGCAGC
hsa-miR-6775-3p~	0.0002	Azalmış	- 39.4971	- 5.3037	CTGGGGCAGAGGAC
hsa-miR-6776-3p	0.0346	Azalmış	- 15.4141	- 3.9462	CTGGGGAGAGACAGT
hsa-miR-6784-3p	0.0237	Azalmış	- 18.9611	- 4.2450	CTGGGGCAGAGTTGG
hsa-miR-6794-3p~	0.0012	Azalmış	- 24.7402	- 4.6288	AGGGAGGGACTGAGA
hsa-miR-6824-3p	0.0432	Azalmış	- 16.5119	- 4.0454	CTGGGGTGGCAAGA
hsa-miR-6847-3p	0.0471	Azalmış	- 11.3239	- 3.5013	GAAGAGGACAGACACA
hsa-miR-7111-3p	0.0226	Azalmış	- 21.0073	- 4.3928	CTGGGAGGAGGGA
hsa-miR-885-5p~	0.0019	Azalmış	- 26.6535	- 4.7363	AGAGGCAGGGTAGTGTA



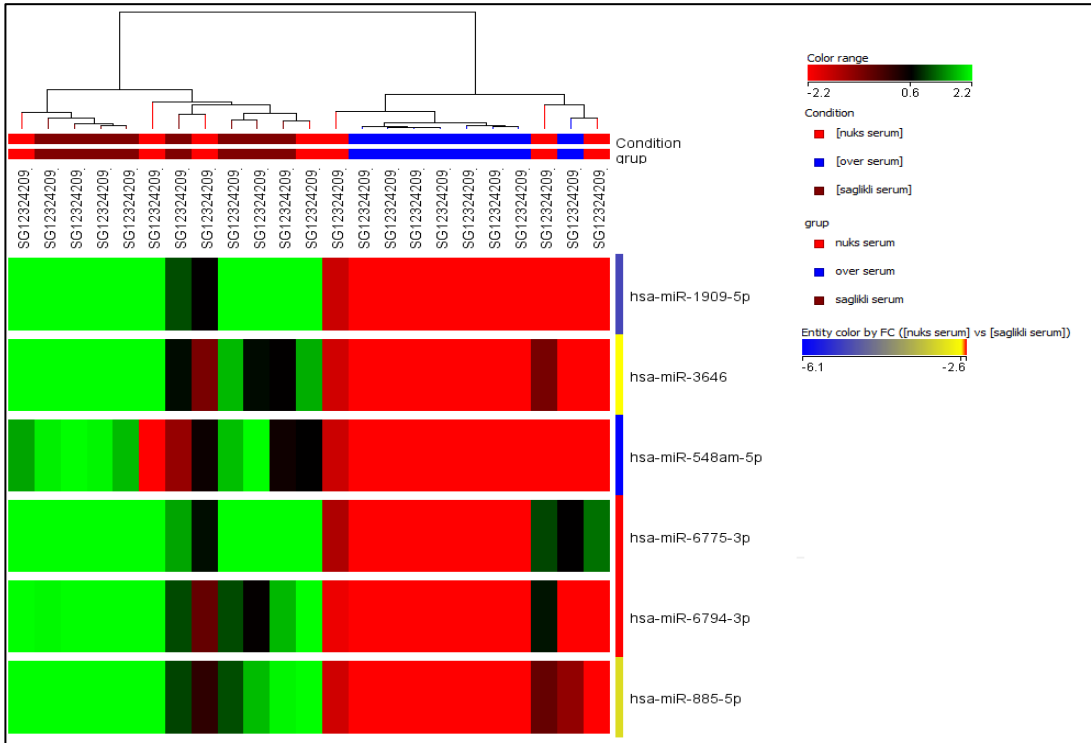
**Şekil 4.10:** Over kanseri ve nüks örnekleri sağlıklıya göre karşılaştırılmasıyla p değeri >0.005 ve FC≥2 olan miRNA'ların anlatım oranlarını gösteren “box-whisker” görüntüsü.

Over kanseri-nüks ve sağlıklı gruplarının karşılaştırılması sonucunda üç grupta da anlatımı değişen miRNA'ların her örnekte anlatımının nasıl değiştiğine gösteren “heat-map” görüntüsü şekil 4.11’de verilmiştir. miRNA’ların farklı gruplarda farklı anlatım yaptığı bu görüntüye göre söylenebilir. Şekil 4.12’de ise p değeri 0.005’den küçük olan 6 miRNA’nın “heat-map” görüntüsü verilmiştir. Farklı gruplarda anlatım oranı açık bir şekilde değişmiştir.





Şekil 4.11: Over kanseri-nüks ve sağlıklı gruplarında anlatımı değişen miRNA'ların hastalardaki değişimleri.



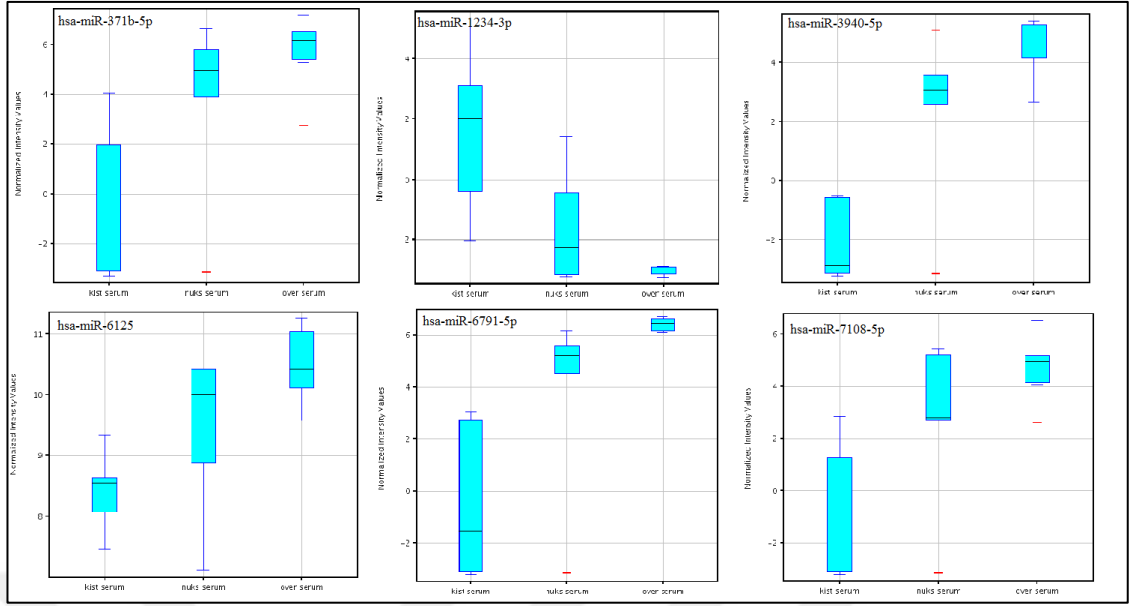
Şekil 4.12: Over-nüks ve sağlıklı serum örneklerinde anlatımı değişmiş olan miRNA'lardan  $p < 0.005$  olan 6 miRNA'nın heat-map görüntüsü.

**Over kanseri-nüks ve kist** örnekleri karşılaştırıldığında ANOVA sonucunda 7 miRNA'nın anlamlı olarak anlatımının değiştiği bulunmuştur. MiRNA'lardan 1 tanesi referans miRNA olduğu için değerlendirilmeden çıkarılmıştır. Anlatımı değişen tüm miRNA'ların FC değerinin 2'nin üstünde olduğu görülmüştür. Sonuç olarak 5 miRNA'nın da anlatımının arttığı 1 tanesinin ise azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.17.). Bu miRNA'ların 238 geni hedeflediği ve bu genlerin görev aldıkları yolak sayısı 150 olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.18:** Over kanser-nüks ve kist grupları arasında anlatım farkı bulunan miRNA'lar, p değerleri, regülasyonu, FC değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sistematik ismi	p değeri (corr)	Regülasyonu	FC	Log FC	aktif dizisi
hsa-miR-1234-3p	0.010203238	Azalmış	-25.5912	-4.67757	GTGGGGTGGGT
hsa-miR-371b-5p	0.021788169	Artmış	99.81114	6.641129	AAAGTGCCGCATCT
hsa-miR-3940-5p	1.38E-04	Artmış	104.8808	6.712607	CAGAGCCCGCCC
hsa-miR-6125	0.031285398	Artmış	4.178352	2.062934	TCCGCCGCTCCG
hsa-miR-6791-5p	0.009986841	Artmış	106.4384	6.733875	TCCGCCTGCCAG
hsa-miR-7108-5p	0.014927878	Artmış	61.47183	5.941854	CCACCCGCCTGC
hur_2	0.012417429	Azalmış	-7.82679	-2.96842	REFERANS

6 miRNA'nın anlatım oranlarının gösterildiği box-whisker görüntüsü Şekil 4.13.'de verilmiştir. Bu görüntülere göre hangi grubun hangisine karşı değerlendirildiği açıkça görülebilir.

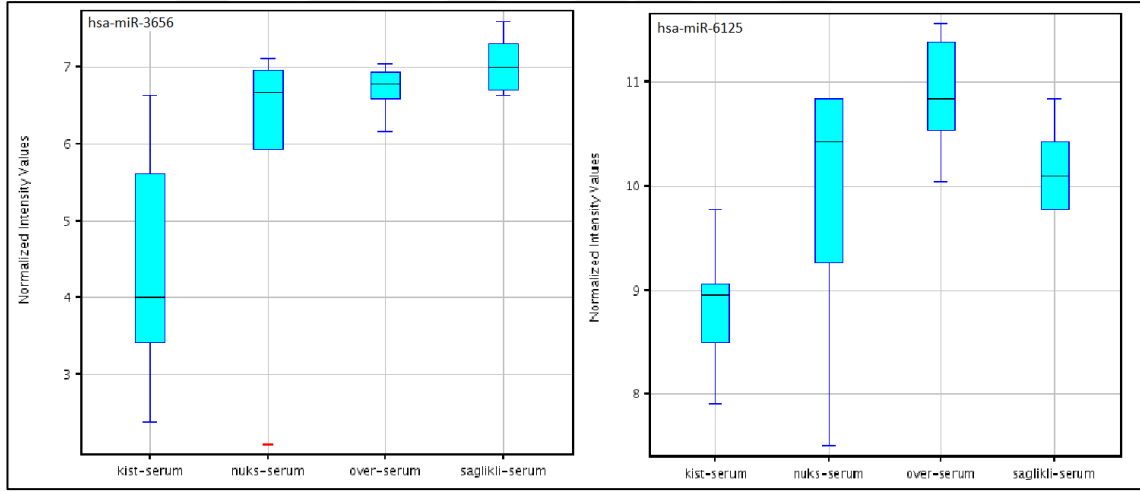


**Şekil 4.13:** Over kanseri-nüks serum örnekleri kiste göre karşılaştırılmasıyla  $FC \geq 2$  olan miRNA'ların anlatım oranlarını gösteren "box-whisker" görüntüsü.

Son olarak 4 grup da kullanılarak analiz yapılmış her grup sağlıklıyla karşılaştırılmış ve ortak olarak anlatım değişikliği gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Farklı anlatımı olan 4 miRNA keşfedilmiş, ikisi referans miRNA'sı olduğu görülmüştür. Nüks ve kist gruplarının sağlıklıyla karşılaştırılmasında iki miRNA'nın anlatımının azaldığı gözlenmiştir. Over kanseri ile sağlıklı grubu karşılaştırıldığında diğer gruplarla ortak olan miRNA'lardan birinin anlatımının arttığı diğerinin azaldığı gözlenmiştir. Tablo 4.18'de tüm gruplarda ortak olarak anlatımı değişmiş miRNA'larının her gruba göre regülasyonu, FC katsayısı, p değeri ve aktif dizisi verilmiştir. Bu miRNA'ların 121 tane geni hedeflediği ve bu hedef genlerin 83 tane yolakta rol aldığı bulunmuştur. Apoptoz, DNA hasar tamiri, sinyalleşme, meme kanseri, prostat kanseri gibi kanserde etkili yollar genlerin rol oynadığı yollardır.

**Tablo 4.19:** Tüm gruplarda ortak olarak anlatımı değişmiş miRNA'larının her gruba göre regülasyonu, FC katsayısı, p değeri ve aktif dizisi.

miRNA'nın sistematik ismi	p değeri (corr)	Kist-sağlıklı			Nüks-sağlıklı			Over-sağlıklı			aktif dizisi
		Regülasyonu	FC	Log FC	Regülasyonu	FC	Log FC	Regülasyonu	FC	Log FC	
dmr_31a	0.0344116	Artmış	2.5940633	1.3752136	Azalmış	-2.8420432	-1.5069284	Artmış	5.0707927	2.3422112	
hsa-miR-3656	0.0221835	Azalmış	-5.98837	-2.5821633	Azalmış	-1.9783069	-0.9842663	Azalmış	-1.2270457	-0.2951889	CCACCC CCGCAC
hsa-miR-6125	0.004539	Azalmış	-2.479703	-1.3101673	Azalmış	-1.2518059	-0.3240109	Artmış	1.6400387	0.7137299	TCCGCC GCTCCG
hur_2	7.35E-04	Artmış	1.2187396	0.2853899	Azalmış	-2.848581	-1.5102434	Azalmış	-6.0549054	-2.5981045	



**Şekil 4.14:** Anlatımları farklı olarak değişmiş olan miRNA'ların (has-miR-3656, has-miR-6125) her grupta değişim oranını gösteren "box-whisker" görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Over kanseri, ovaryumlarda başlayan ve genelde vücuda yayılan bir kanser türüdür (Edmondson ve diğ, 2001). Hayatta kalma oranı düşük olan ve hızlı yayılma gösteren heterojen bir hastalıktır ve jinekolojik kanser kaynaklı ölümlerin en önemli nedenidir (Chu ve Rubin, 2005). Dünyada kadınlar arasında kanserle ilişkili ölümlerin beşinci önemli nedeni olarak gösterilir (Alain, 2008) (Tablo 2.1.). Ovaryum kanserinin geç evrelere kadar asemptomik olması ve hastalığın erken evrelerinde tanı koyulabilmesi için etkili bir tarama testinin henüz bulunmaması nedeniyle hastalık tanısı erken evrelerde yapılamamaktadır. Bunun bir sonucu olarak da 5 yıllık sağ kalım oranı %45'i geçememektedir (American Cancer Society, 2011). Over kanseri gelişimini tespit eden radyografik görüntüleme, invaziv biyopsiler, tümör belirteçleri ve bu metodların birleştirilmesiyle oluşmuş eski ve yeni birçok yöntem vardır. Fakat over kanseri hala en yaygın ve ölümcül jinekolojik kanser olarak görülür. Mümkün olan en az girişimsel işlemle over kanserinin tanısı için spesifik biyobelirteçlerin kullanılması çok önemlidir. Bu nedenle over kanserine yüksek hassasiyet gösteren erken tanı biyobelirteçlerinin tanınması ve validasyonu yapılması gerekir. Bu bağlamda yaptığımız çalışma ileri validasyonlarla birleştirilmek şartıyla biyobelirteç belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

Over kanseri tanısında gen, protein, metabolit ve mikroRNA temelli biyobelirteçler kullanılabilir. miRNA anlatım profilleri dokuların gelişimsel orijinleriyle paraleldir, kanser tanı ve sınıflandırılmasında biyobelirteç olarak potansiyeli mRNA'dan daha fazladır (Lu ve diğ, 2005). MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda kodlama yapmayan RNA genlerinden anlatım yapan fakat protein kodlayaman RNA'lardır. Translasyonun baskılanmasını veya mRNA'nın yıkımını, diziye özel gen düzenlenmesini sağlar böylece gelişme, hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenler (Zhang B, 2011). İnsan genlerinin yaklaşık %3'ü miRNA kodlarken protein kodlayan genlerin yaklaşık %30'u miRNA'lar tarafından düzenlenir. Bu miRNA'lar her hücre tipine, hücrenin gelişme ve farklılaşma evresine göre değişir. Yapılan çalışmalara göre farklı anlatım yapan ya da mutasyonlu

miRNA'ların; hedef genine göre değişen yeni bir onkogen veya tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak kanser gelişimde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Iorio ve diğ, 2007).

Araştırma kapsamında; sağlıklı bireylerden, primer epitelyal over kanser teşhisi konulmuş hastalardan, daha önce over kanseri geçmişi olup tekrar nüks etmiş hastalardan ve basit over kisti bulunan hastalardan elde edilen kan ve doku örnekleriyle çalışılmıştır. Tez kapsamında gruplandırma 2 deney (over kanseri ve nüks) ve 2 kontrol (basit over kisti ve sağlıklı) olmak üzere toplam 4 grup olarak tasarlanmıştır. Sağlıklı grup hariç diğer araştırma gruplarından hem periferal kandan elde edilen serum hem de tümör (ya da kist) dokuları alınmıştır. Sağlıklı grubundan sadece serum alınmıştır. Bu araştırmada toplanan serum ve tümör veya kist dokularının izolasyon yapılmış ve elde edilen RNA kalitesi en yüksek olan 8'er örnek mikroarray çalışmasında kullanılmıştır. Gruplar arası değerlendirmeler yapılarak anlatımı değişmiş miRNA'lar bulunmuştur.

Şekil 4.3.'de gösterildiği gibi, dokuda 178 tane miRNA'nın üç grupta da anlatım yaptığı tespit edilmiş ve bunlardan 58 tanesinin aynı gruplara ait serum örneklerinde de anlatım yaptığı gösterilmiştir. Bu veriye dayanarak doku örneklerinden seruma geçişin olduğu kanıtlanmıştır.

## 5.1. DOKU ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN MİRNA'LAR

Doku örneklerinde, over kanseri ve nüks grubu; kontrol grubu olarak basit over kistiyle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar ikili ve üçlü gruplar halinde yapılmış ve anlatımı değişen miRNA'lar, hedef genler ve genlerin etkili olduğu yollar belirlenmiştir. Çalışmanın esas amacına yönelik olarak “over kanseri-basit over kisti”, “nüks-basit over kisti” ve “over kanseri-nüks-basit over kisti” karşılaştırmalarından elde edilen miRNA'lar daha önem kazanmaktadır. Nüks ile over kanseri karşılaştırması iki kanser türü arasındaki miRNA anlatım farkını vererek nüks olan tümörlerde hangi yollarda değişiklik olabileceği hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar.

**Over kanseri dokularıyla kist dokuları** karşılaştırılması sonucu tablo 4.6'da özellikleri verilen 3 miRNA'nın (hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-4665-3p, hsa-miR-6737-3p) anlatımı artmıştır. *Hsa-miR-200c-3p*; hsa-miR-200c miRNA ailesine aittir. “The mir-Ontology Database” de bu miRNA ailesi araştırıldığında over kanseri ile ilişkili

olduğu gösterilmiş, hedef gen olarak CYP1B1 (“cytochrome P450 family 1 subfamily B member 1”) verilmiştir. Bu gende meydana gelen mutasyonlar veya polimorfizmler tümör baskılayıcı genlerde mutasyona sebep olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ryk ve diğ, 2005). Iorio ve diğ (2007), over kanseri ile normal örnekler arasında analiz yapmış ve has-miR-200c'nin anlatımının over kanserinde arttığını gözlemlemiştir. Hedeflediği genler araştırıldığında birçok tümör baskılayıcı gen tespit edilmiştir. Bu miRNA'nın anlatımının artması ile tümör baskılayıcı genlerin anlatımı azalacağı için kansere yol açacaktır. Yaptığımız çalışmada da aynı aileye sahip has-miR-200c-3p'nin anlatımı kontrol grubuna göre artmıştır (Tablo 4.6). Ayrıca “QIAGEN Ovarian Cancer miScript miRNA PCR Array” Real-time PCR temelli miRNA profillemeye kitiyle over kanseri tanısı yapılmakta ve bu ticari kitede hsa-miR-200c-3p analizi yapılan miRNA'lar arasında yer almaktadır. Bu miRNA'nın anlatımının over kanserinde arttığı kitede belirtilmiştir. Bu da yaptığımız çalışmanın doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Aynı grupta bulunan bir diğer anlatımı artmış miRNA; **hsa-miR-4665-3p**'dir. Bu miRNA'nın **over kanseri-nüks-kist dokularının** l karşılaştırılmasında da anlatımının arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.8.). l analizde FC değerlerine bakıldığında over kanserinde (FC=26.337) nüks grubuna (FC=2.3706) göre yaklaşık 13 kat daha fazla anlatım farkının olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler de hsa-miR-4665-3p'nin over kanserinin gelişiminde önemli olabileceğini ortaya koymuştur. Bu miRNA'nın hedeflediği genler “miRBase” veri tabanında araştırılmış ve hedeflediği genler belirlenmiştir. “miRDB”den elde edilen hedef gen analizinde WDR4 (WD repeat domain 4) hedef genlerden birisidir ve hücre döngüsünde, sinyalleşmede, apoptozda ve gen regülasyonunda rol oynayan önemli gen ailesidir. Anlatımı artmış hsa-miR-4665-3p'nin bu genin ürünlerini hedeflemesi genin anlatımının azalmasına ve hücrenin kanserleşmesine neden olacaktır. Persson ve diğ, (2011)'nin yaptığı çalışmada normal ve meme kanseri dokularını karşılaştırılmış ve hsa-miR-4665'in tümör dokularında anlatımı arttığı gözlenmiş. Analizi yapılan ve BRCA1 genlerinde mutasyon olan örneklerin yaklaşık %35'inde hsa-miR-4665'in anlatımının arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre over kanserinde de etkili olan BRCA genleriyle ilişkisinin olması bu miRNA'yı over kanseri için de önemli kılmaktadır. **Hsa-miR-6737-3p** hakkında çok fazla bilgiye ulaşılmamıştır. Bu konuda ileri analizlere gidilip validasyonu tamalanırsa over kanseri biyobelirteci olarak literatüre kazandırılabilir.

**Nüks-over kanseri** dokularında karşılaştırma yapıldığında *hsa-miR-3656*'nın anlatımının over kanserinde azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.7.). Bu miRNA'nın bazı serum gruplarında da ortaklığı tespit edilmiştir. "Over kanseri-nüks-kist-sağlıklı" serum grubuna bakıldığında (Tablo 4.16) ortak olarak anlatımı değişmiş miRNA'lardan bir tanesi *hsa-miR-3656* olduğu görülmüştür. FC değerlerine bakıldığında hepsinde anlatımının azaldığını fakat azdan çoğa doğru FC değerlerine göre sıralandığında en az anlatım değişikliğinin over kanserinde (FC=1.2270), daha sonra nüks grubunda (FC=1.9783) olduğu en çok değişimin ise kist dokusunda (FC=5.9883) meydana geldiği görülmüştür. Bu miRNA'nın hedeflediği genler "miRDB" veritabanında bakıldığında apoptoz, otofaji, hücre döngüsünde görev alan genler, tümör baskılayıcı genler olduğu görülmüş. Over kanserinde diğerlerine göre daha fazla anlatım yapılması bu miRNA'nın hedefi olan tümörü engelleyici genlerin anlatımını azaltacak ve tümör oluşumuna neden olacaktır. Dokuda tespit edilen, nükse göre anlatımının azalma oranının az olması over kanseri ile nüks etmiş oluşumların birbirine benzer karakterde olmasıyla açıklanabilir. *Hsa-miR-3656*'nin over kanseri ile ilişkili olduğuna dair literatüre rastlanmamıştır. Doku gruplarında da anlatımının değişmiş olması ve serum örneklerinde tüm gruplarda azalması bu miRNA'nın önemini arttırmakta ve validasyon gerektirmektedir. Eğer validasyonla doğrulanırsa serum biyobelirteç olarak önemli bir aday niteliği taşıyacaktır.

**Nüks örnekleri ile kist doku** örneklerinin karşılaştırılmasında nüks örneklerinde 8 anlatımı artmış 2 tane anlatımı azalmış miRNA tespit edilmiştir (Tablo 4.5.). *Hsa-let-7b-5p*'nin dahil olduğu *hsa-let-7b* ailesi "The mir-Ontology Database"de araştırılmış ve over kanseriyle doğrudan ilişkili olan miRNA'lardan olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı veritabanında hedeflediği genlere bakıldığında TGFBR1 ("transforming growth factor beta receptor 1"), FASLG ("Fas ligand") ve ITGB3 ("integrin subunit beta 3") gibi sinyalleşme, apoptoz ve hücre adezyonunda görev alan genlerin yer aldığı görülmüştür. Anlatımı azalmış bir diğer miRNA ise *hsa-miR-145-5p*'dir ve bu grup içinde FC değerlerine göre anlatım oranı en çok değişmiş olan miRNA'dır. "miRDB" veritabanında hedef genlerinden biri ANGPT2 ("angiopoietin 2") olarak gösterilir. Bu gen epitel hücrelerinin apoptoza gitmesini indükler (RefSeq, Temmuz 2008). Bunun dışında tümör baskılayıcı genler, sinyalleşme yollarında rol oynayan genler gibi kanserleşmede rol oynayan birçok hedef gen *hsa-miR-145-5p*'nin hedefidir. Ayrıca bu



grupta elde edilen miRNA'lerden 4 tanesi (hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c, hsa-miR-125-5p, hsa-miR-145-5p)'nin "QIAGEN Ovarian Cancer miScript miRNA PCR Array" kitinde anlatımı azalan miRNA'lar arasında over kanseri tanısı için kullanılmaktadır. Tüm bu verilere dayanarak dokular arası analizlerde elde edilen anlatımı değişmiş miRNA'ların çoğunun kanserle ilişkisi olduğu görülmüştür.

## 5.2. SERUM ÖRNEKLERİNDEN ELDE EDİLEN MİRNA'LAR

Serum örneklerinde over kanseri-nüks-basit over kisti ve sağlıklı olmak üzere 4 grupta çalışılmış ve gruplar kendi aralarında ikili, üçlü ve dörtlü olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılarak ortak olan miRNA'lar tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak sağlıklılar alınmıştır. Sağlıklı grubunun dahil edilmediği gruplamalarda kist serumları kontrol olarak kullanılmıştır. Over kanseri gruplarının kontrollerle karşılaştırıldığı gruplamalar bu çalışma için daha fazla önem taşımaktadır. Anlatımları anlamlı olarak değişen ve analize alınmaya en uygun görülen (p değeri 0.005'den küçük ve FC $\geq$ 2) miRNA'lar "miRBase, The mir-Ontology Database, HMDD, mir2disease" veritabanlarında kanserle ilişkilendirmek üzere araştırılmıştır.

**Over kanseri-nüks-sağlıklı** karşılaştırılmasında 21 tane anlatımı azalmış miRNA elde edilmiştir (Tablo 4.16). Bu miRNA'lar **over grubunun sağlıklılarla** karşılaştırılmasından elde edilen sonuçlarla (31 miRNA) (Tablo 4.10.) beraber değerlendirildiğinde 21 miRNA'nın 20 tanesi over-sağlıklı grubunda da yer aldığı gözlenmiştir. Bu 20 tane ortak miRNA'dan p değerleri 0.005'in altında olan 6 tanesi seçilmiştir (Tablo 4.16). **Hsa-miR-6775-3p ve hsa-miR-6794-3p** hakkında yapılmış çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Yaptığımız çalışma ile iki miRNA'nın da p değerinin 0.002'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Over kanserinde anlatımlarının azalma oranı (FC $\geq$ 24) nükse (FC=2) göre çok daha fazla olması bu gruptan elde edilen miRNA'ların analizinin önemini arttırmaktadır. Bu nedenle elde edilen bu miRNA'ların validasyonlarla kanserle ilişkisi kurulması önerilebilir. Ayrıca hsa-miR-6775 ailesinden olan hsa-miR-6775-5p kist serum gruplarında da rastlanmış (Tablo 4.16.) ve anlatımının azaldığı tespit edilmiştir. P değeri<0.005 olan bir diğer miRNA **hsa-miR-3646**'nın over kanserinde (sağlıklı grup kontrol alınarak) nükse göre FC değeri 13 kat artmıştır.

Hedeflediği genler miRDB veritabanında bakıldığında ATG9A (“autophagy related 9A”), RAB33A (“member RAS oncogene family”), CADM2 (“cell adhesion molecule 2”), BCL2L13 (“BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)”) gibi genler olduğu tespit edilmiştir. hsa-miR-3646’nın anlatımının azalmasıyla bu genlerin anlatımlarının artacağı göz önünde bulundurulduğunda kanserle önemli ilişkisi olduğu söylenebilir. Over kanseriyle yapılan çalışmalarda değişmiş anlatım yapan bu miRNA’ya rastlanmamıştır. Over-sağlıklı karşılaştırmasında FC katsayısı 29.5675, over-nüks-sağlıklı karşılaştırmasında FC değeri 47.7413 olan bir diğer miRNA ise **hsa-miR-1909-5p**’dir. Bu miRNA’nın da over kanseri ile ilişkisine literatürde rastlanmamıştır. miRBase ve miRDB’de yapılan taramalara göre 123 tane hedef geni olduğu ve TGFA (“transforming growth factor, alpha”), RAB15 (“member RAS oncogene family”) gibi kanserde etkili genleri hedeflediği tespit edilmiştir. **Hsa-miR-548am-5p** yaptığımız çalışmada önemli sayılabilecek bir miRNA’dır çünkü “over kanseri-nüks-sağlıklı”, “over-sağlıklı” ve “kist-sağlıklı” gruplarının hepsinde anlatımının azaldığı ve en çok anlatım değişiminin over kanseri grubunda olduğu gözlenmiştir. MiRDB veritabanına göre RAB27B (“member RAS oncogene family”), PRKCI (“protein kinase C, iota”), PIK3CB (“phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta”) gibi Tablo 2.3.’de verilen onkogenlerden bazılarının bu miRNA tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Over kanseriyle ilişkili yayınlara bakıldığında bu miRNA’ya rastlanmamıştır. **Hsa-miR-885-5p**’nin over kanseri serum örneklerinde fazlaca anlatımının azalması (FC=26,6535) önemini arttırmıştır. Literatür araştırması yapıldığında Laudanski ve diğ, (2013) over endometriyozis hastalarından alınan endometriyum dokularıyla kontrol gruplarını karşılaştırmış ve bizim çalışmamızda bulunanın aksine bu miRNA’nın anlatımının kontrol gruplarına göre oldukça fazla olduğunu tespit etmiştir. Aynı şekilde Gui ve diğ, (2011) yaptığı bir çalışmada kronik hepati B ve gastrik kanser hastalarından alınan dokular sağlıklılarla karşılaştırıldığında has-miR-885-5p’nin anlatımının arttığı gözlenmiştir. Bu verilere dayanarak bizim çalışmamızda anlatımı azalan has-miR-885-5p’nin validasyonlarının yapılması gerektiği ileri sürülebilir.

**Over-sağlıklı serum** grubunda anlatımı azalmış olan miRNA’lardan over-nüks-sağlıklı grubunda yer almayan miRNA’lar da tespit edilmiş ve p değeri  $\leq 0.001$  ve FC katsayısı 10’dan fazla olan 2 miRNA seçilmiştir. Anlatımı azalan miRNA’lardan **has-let-7d-3p**

kanserde oldukça önemli role sahip olan let-7d ailesindedir. Bu gen ailesi “miR2disease” veritabanında araştırıldığında, Park ve diğ (2007), Iorio ve diğ (2007), over kanseri hastalarında yapılan analize göre anlatımının azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca bir başka çalışmada EOK hücre hatlarıyla kontrol hücre hatları miRNA anlatımı bakımından karşılaştırılmış ve has-let-7d'nin anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Zhang ve diğ, 2008). Literatürde rastlanmayan has-let-7d-3p'nin valide edilip anlatımı kanıtlandıktan sonra potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılması önerilebilir. **Hsa-miR-449c-3p** over kanseri serum örneklerinde anlatımı anlamlı olarak azalan bir diğer miRNA'dır. Kheir1 ve diğ. (2011) yaptığı bir çalışmaya göre aynı aileden olan has-miR-499'un hücre bölünmesini azalttığı ve gastrik kanserde anlatımının azaldığını tespit etmiştir. KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), RAB11FIP2 (RAB11 family interacting protein 2 (class I)) gibi has-miR-449-3p'nin hedef onkogenleri miRDB veritabanından bulunmuştur.

Over kanseri-nüks-kist serum grubu (Tablo 4.17.) ile over kanseri-kist serum grubu (Tablo 4.11.) arasında 3 tane ortak miRNA bulunmuştur. **Hsa-miR-1234-3p**'nin anlatımı iki grupta da azalırken, **hsa-miR-6125** ve **hsa-miR-7108-5p** anlatımları iki grupta da artmıştır. Bu miRNA'ların p değerlerinin 0.01'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Üç miRNA'nın da kanserle ilişkili olarak literatürde yapılmış çalışmasına rastlanmamıştır. Over kanseri-kist değerlendirmesinde hsa-miR-7108-5p'nin FC değeri 49.2480 olduğu ve over kanseri-kist-nüks değerlendirmesinde aynı miRNA'nın FC değerinin 15.3712 olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlerle üç miRNA'nın içinde anlatımı en çok değişen miRNA hsa-miR-7108-5p olduğu belirtilmiştir.

Zhang ve diğ. (2008) çalışmasına bakılarak over kanserinde meydana gelen miRNA'ların anlatım farklarının DNA kopya sayı değişikliklerinden, epigenetik değişimlerden, mutasyonlardan, transkripsiyonel düzenleme değişimlerinden ve efektif olmayan miRNA biyogenez yolağından kaynaklanabileceği ileri sürülebilir. Bu çalışmaya göre çoğu miRNA'nın EOK hastasında azaldığı tespit edilmiş ve bunun nedenini genel olarak kopya sayısı kaybı ve epigenetik susturmalar olduğu belirtilmiştir. Yürütülmüş olan bu tezde de Zhang ve diğ. (2008) elde ettiği verilere benzer şekilde serum örneklerinde anlamlı olarak elde edilen tüm miRNA'larının yaklaşık %75'nin anlatımında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Tezden elde edilen ve ileri araştırmalarla desteklenmesi gereken bir diğer veri ise over kanseri ile nüks serum gruplarının sağlıklılarla karşılaştırılması sonucu ortak olarak değişen miRNA'larının büyük çoğunluğunun FC değerinin over kanserinde çok daha fazla olduğudur. Bu bulguya göre nüks etmiş kanserlerde immün sistem kaynaklı veya ilk kanser öyküsü sonrası alınan kemoterapi kaynaklı olabileceği düşünölen miRNA anlatım değişikliğinde azalma olmuş olabilir. şuanda yalnızca bir hipotez olan bu düşünce ileride araştırılmalı ve doğruluğu gösterilmelidir.

Literatürde kanserle ilişkisine rastlanmayan miRNA'ların herbiri potansiyel yeni bir biyobelirteç özelliği taşımaktadır. Anlamalı anlatım değişikliğii gösteren bu miRNA'ların validasyonlar, hedef mRNA'lar ve proteinler bazında yapılan analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. Over kanseriyle ilişkisi kanıtlanmış olan miRNA'lar ise biyobelirteç olarak over kanserinin veya nüks etmiş over kanserlerinin erken tanı panellerine eklenerek bu ölümcül hastalığın ölüm oranını azaltmak için kullanılabilir.

Kanserleşmenin erken tanısında ve tedavisinde ileri moleküler genetik sistemlerden yararlanma günümüzde zorunlu hale gelmiştir. Çağın hastalığı olan kanserin tedavi stratejilerinin değişmesi ve gelişmesi moleküler anlamda daha çok bilginin elde edilmesi ile mümkündür. Bu tez kapsamında jinekolojik kanserlerde ölüm oranı en fazla olan over kanserinin tanısında biyobelirteç olarak saptamaya çalıştığımız miRNA'lar literatüre katkı sağlayacağı gibi çalışılan hasta sayılarının arttırılarak belirlediğimiz miRNA'ların "Real-time PCR"ile validasyonları ile daha biyobelirteç olarak kullanımları gerçek olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Ahmed, N., Oliva, K.T., Barker, G., ve diğ., 2005, Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer, *Proteomics*, 5, 4625–36.
- Aldridge, S., Hadfield, J., 2012, *Introduction to miRNA Profiling Technologies and Cross-Platform Comparison*, Methods in Molecular Biology, 822, Humana Press, USA, ISBN 978-1-61779-426-1.
- Allain, D.C., 2008, Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology, *J. Mol. Diagn*, 10(5), 383–395.
- Allard, W.J., Matera, J., Miller, M.C., Repollet, M., Connelly, M.C., Rao, C., Tibbe, A.G., Uhr, J.W., Terstappen, L.W., 2004, Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clinical Cancer Research*, 10, 6897-6904.
- Almeida, M.I., Reis, R.M., Calin, G.A., 2011, MicroRNA history: Discovery, recent applications and next frontiers, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1-2), 1-8.
- Ambros, V., 1989, A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*, *Cell*, 57(1), 49-57.
- American Cancer Society, 2011, Ovarian Cancer, *Global Cancer Fact & Figures (2nd Edition)*. American Cancer Society, Atlanta, GA, USA.
- American College of Obstetricians and Gynecologists., 2009, PROLOG Gynecology and Surgery (6th Edition). American College of Obstetricians and Gynecologists, Washington, DC, USA.
- Bang, C., Thum, T., 2012, Exosomes: new players in cell-cell communication, *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 2060-2064.
- Bashir, A., 2010, Designing deep sequencing experiments: detecting structural variation and estimating transcript abundance, *BMC Genomics*, 11 , 385–99.
- Bast, R.C. Jr, Klug, T.L., St John, E. ve diğ, 1983, A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 309(15), 883–887.
- Bast, R.C., 2004, Early detection of ovarian cancer: new technologies in pursuit of a disease that is neither common nor rare, *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 115, 233–47.

- Bast, R.C., Hennessy, B., Mills G.B., 2009, The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation, *Nat Rev Cancer*, 9(6), 415.
- Bast, R.C., Mills, G.B., 2008, *The Molecular Basis of Cancer*. 3rd edn. Mendelsohn, J., Howley, P., Israel, M., Gray, J.; Thompson, C., editors. Philadelphia: W. B. Saunders Co., p. 441-455.
- Berek, J.S., 2004, *Novak Jinekoloji*. Erk A (Ed). Over Kanseri'nde. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1245-321.
- Berek, J.S., Crum, C., Friedlander, M., 2012, Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 119(2), 118-129.
- Brabek, J., Mierke, C.T., Rosel, D., Vesely, P., Fabry, B., 2010, The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion, *Cell Commun Signal*, 8, 22.
- Britton, K.M., Eyre, R., Harvey, I.J., Stenke-Hale, K., Browell, D., Lennard, T.W., Meeson, A.P., 2012, Breast cancer, side population cells and ABCG2 expression. *Cancer Letters*, 32, 97-105
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., 2005, *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry: Palme yayıncılık*.
- Calin, G.A., Croce, C.M, 2006, MicroRNA signatures in human cancers, *Nat Rev Cancer*, 6, 857–866.
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006b, MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells, *Oncogene*, 25, 6202–10.
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., ve diğ., 2005, MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med*, 353: 1793–801.
- Calin, G.A., ve diğ, 2002, Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99,15524–15529.
- Camussi, G., Deregibus, M.C., Bruno, S., Cantaluppi, V., Biancone, L., 2010, Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication, *Kidney Int* 78, 838-848.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., ve diğ., 2005, Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, 33, e179-88.
- Chen, C., Wei, Y., Hummel, M., Hoffmann, T.K., Gross, M., Kaufmann, A.M., Albers, A.E., 2011, Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma, *PLoS One*, 6, 16466.

- Chen, Y., Chen, G., Feng, S., Pan, J., Zheng, X., Su, Y., Chen, Y., Huang, Z., Lin, X., Lan, F., Chen, R., Zeng, H., 2012, Label-free serum ribonucleic acid analysis for colorectal cancer detection by surface-enhanced Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Biomedical Optics*, 17, 067003.
- Chu, C.S., Rubin, S.C., 2005, Screening for ovarian cancer in the general population, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 20(2), 307–320.
- Cohen, L.S., Escobar, P.F., Scharm, C., Glimco, B., Fishman, D.A., 2001, Threedimensional power Doppler ultrasound improves the diagnostic accuracy for ovarian cancer prediction, *Gynecol Oncol*, 82(1), 40–48.
- Cragun, J.M., 2011, Screening for ovarian cancer, *Cancer Control*, 18(1), 16-21.
- Cristofanilli, M., Broglio, K.R., Guarneri, V., Jackson, S., Fritsche, H.A., Islam, R., Dawood, S., Reuben, J.M., Kau, S.W., Lara, J.M., Krishnamurthy, S., Ueno, N.T., Hortobagyi, G.N., Valero, V., 2007, Circulating tumor cells in metastatic breast cancer: biologic staging beyond tumor burden. *Clinical Breast Cancer*, 7, 471-479
- Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., Hayes, D.F., 2004, Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. Clinical Utility of CTCs *The Journal of Molecular Diagnostics*, 351, 781-791
- Debnath, J., Brugge, J.S., 2005, Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures, *Nat Rev Cancer*, 5, 675-688.
- Denkert, C., Budczies, J., Kind, T., ve diğ, 2006, Mass spectrometry-based metabolic profiling reveals different metabolite patterns in invasive ovarian carcinomas and ovarian borderline tumors, *Cancer Res*, 66, 10795–804.
- Dieplinger H, Ankerst DP, Burges A, ve diğ, 2009, Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 1127–33.
- Dina, R., Rustin, G., Soutter, W.P., 2002, Carcinoma of the ovaries and fallopian tubes', in Shaw, Soutter WP, Stanton SL (eds) *Gynaecology*, London: Churchill Livingstone.
- Drapkin, R., Von Horsten, H.H., Lin, Y., ve diğ, 2005, Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas, *Cancer Res.*, 65(6), 2162–2169.
- Drasin, D.J., Robin, T.P., Ford, H.L., 2011, Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity, *Breast Cancer Res*, 13, 226.
- Edmondson, R. J., Monaghan, J. M., 2001, The epidemiology of ovarian cancer, *Int. J. Gynecol. Cancer*, 11: 423-429.

- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., 2006, Oncomirs—microRNAs with a role in cancer, *Nat Rev Cancer*, 6, 259–269.
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S.B., Herman, J.G., 1999, Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Research*, 59, 67-70
- Fan, J.B.(ed.), 2012, *Next-generation microRNA expression profiling technology, Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, 822, Humana Press, USA, ISBN 978-1-61779-426-1.
- Fan, H.C., Blumenfeld, Y.J., Chitkara, U., Hudgins, L., Quake, S.R., 2008, Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 , 16266–71.
- FIGO, 2014, *Ovarian Cancer Staging Effective*.
- Fishman, D.A., Cohen, L., Blank, S.V., ve diğ, 2005, The role of ultrasound evaluation in the detection of early-stage epithelial ovarian cancer, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192(4), 1214–1221.
- Gagnon, A., Ye, B., 2008, Discovery and application of protein biomarkers for ovarian cancer, *Curr Opin Obstet Gynecol*, 20:9–13.
- Gahan, P.B., 2012, Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 12, 360-370
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D.C., 2001, Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001, 945, 265-275
- Giovannetti, E., van der Velde, A., Funel, N., Vasile, E., Perrone, V., Leon, L.G., De Lio, N., Avan, A., Caponi, S., Pollina, L.E., Galla, V., Sudo, H., Falcone, A., Campani, D., Boggi, U., Peters, G.J., 2012, High-throughput microRNA (miRNAs) arrays unravel the prognostic role of MiR-211 in pancreatic cancer, *PLoS One*, 7,49145.
- Gocke, C.D., Kopreski, M.S., Benko, F.A., Sternas, L., Kwak, L.W., 2000, Serum BCL2/IGH DNA in follicular lymphoma patients: a minimal residual disease marker, *Leukemia & Lymphoma* 2000, 39, 165-172
- Godfrey, A.C., Xu, Z., Weinberg, C.R., Getts, R.C., Wade, P.A., DeRoo, L.A., Sandler, D.P., Taylor, J.A., 2013, Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort, *Breast Cancer Res*, 15, R42.
- Gold, B., Cankovic, M., Furtado, L.V., Meier, F., Gocke, C.D., 2015, Do Circulating Tumor Cells, Exosomes, and Circulating Tumor Nucleic Acids Have Clinical



Utility? A Report of the Association for Molecular Pathology, *The Journal of Molecular Diagnostics*, 17(3).

- Gossett, D.R., Weaver, W.M., Mach, A.J., Hur, S.C., Tse, H.T., Lee, W., Amini, H., Di Carlo, D., 2010, Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3249-3267
- Granberg, S., Wikland, M., Jansson, I., 1989, Macroscopic characterization of ovarian tumors and the relation to the histological diagnosis: criteria to be used for ultrasound evaluation, *Gynecol Oncol*, 35(2), 139–144.
- Groger, C.J., Grubinger, M., Waldhor, T., Vierlinger, K., Mikulits, W., 2012, Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression, *PLoS One*, 7, 51136.
- Gui, J., Yan, Y., Wen, X., Zhang, W., Zhang, P., Gao, J., Run, W., Tian, L., Jia, X., Gao, Y., 2011, Serum microRNA characterization identifies *miR-885-5p* as a potential marker for detecting liver pathologies, *Clinical Science*, 120, 183–193.
- Gunel, T., Hosseini, M K., Gumusoglu, E., Dolekcap, I., Aydinli, K., 2014, Future Perspective of Preeclampsia by miRNA, *Pharma publisher*, 10, 68-78.
- Hafner, M., Landgraf, P., Ludwig, J., Rice, A., Ojo, T., Lin, C., ve diğ, 2008, Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing, *Methods*, 44 , 3–12.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., ve diğ., 2006, Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex, *Cell*, 125, 887-901.
- Hastings, M.L., Palma, J., Duelli, D.M., 2012, Sensitive PCR-based quantitation of cell-free circulating microRNAs, *Methods*, 58,144-150.
- Hausler, S.F.M., Keller, A., Chandran, Ziegler, K., Zipp, K. ve diğ., 2010, Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening, *British Journal of Cancer*, 103(5), 693 – 700.
- He, L., ve diğ, 2005, A microRNA polycistron as a potential human oncogene, *Nature*, 435,828–833.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996, Real time quantitative PCR, *Genome Res*, 6 , 986–94.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., Falk, K.I., 1999, Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*, 93, 3956-3963
- Hou, H.W., Warkiani, M.E., Khoo, B.L., Li, Z.R., Soo, R.A., Tan, D.S., Lim, W.T., Han, J., Bhagat, A.A., Lim, C.T., 2013, Isolation and retrieval of circulating tumor cells using centrifugal forces. *Scientific Reports*, 3, 1259

- Hutvágner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., ve diğ., 2001, A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA, *Science*, 293(5531), 834-8.
- Ibanez de Caceres, I., Battagli, C., Esteller, M., ve diğ, 2004, Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients, *Cancer Res*, 64, 6476–81.
- Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., ve diğ, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer, *Cancer Res*, 2005, 65:7065–70.
- 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., Me'nard, S., Croce, C.M., 2007, MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer, *Cancer Res*, 67(18), 8699-8707.
- Jacobs, I.J., Menon, U., 2004, Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer, *Molecular & Cellular Proteomics*, 3, 355–366.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D., Knippers, R., 2001, DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Research*, 61, 1659-1665
- Katsuda, T., Kosaka, N., Ochiya, T., 2014, The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers, *Proteomics*, 14, 412-425.
- Kheir1, T.B., Futoma-Kazmierczak, E., Jacobsen, A., Krogh, A., Bardram, L., Hother, C., Grønbaek, K., Federspiel, B., Lund, A.H., Friis-Hansen, L., 2011, miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 10(29), 1-12.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S.D., 2003, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell*, 115, 209-16.
- Kim, K., Visintin, I., Alvero, A.B., Mor, G., 2009, Development and validation of a proteinbased signature for the detection of ovarian cancer, *Clin Lab Med*, 29, 47–55.
- Kindelberger, D.W., Lee, Y., Miron A ve diğ, 2007, Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am. J. Surg. Pathol.* 31(2), 161–169.
- Kloosterman, W.P., Wienholds, E., Bruijn, E.D., Kauppinen, S., Plasterk, R.H.A., 2006, In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes, *Nat Methods*, 3, 2005–7.
- Konstantinopoulos, P.A., Spentzos, D., Cannistra, S.A., 2008, Gene-expression profiling in epithelial ovarian cancer, *Nat Clin Pract Oncol*, 5, 577–87.

- Kopreski , M.S., Benko, F.A., Kwak, L.W., Gocke, C.D., 1999, Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clinical Cancer Research*, 5, 1961-1965
- Kopuz, E., Saip, E., Salihoglu, Y., 2000, Jinekolojik tümörler, *Klinik Onkoloji*, 289-290.
- Köse, R.M., Başara, B.B., Yentür, G.K., 2014, T.C. Sağlık bakanlığı sağlık istatistikleri yıllığı 2013, Ankara, ISBN: 978-975-590-508-2.
- Kramer, R.H., Vogel, K.G, 1984, Selective degradation of basement membrane macromolecules by metastatic melanoma cells, *J Natl Cancer Inst* 72, 889-899.
- Kurjak, A., Kupesic, S., Sparac, V., Kosuta, D., 2000, Three-dimensional ultrasonographic and power Doppler characterization of ovarian lesions, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 16(4), 365–71.
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., and Aravin, A., ve diğ., 2007, A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing, *Cell*, 129, 1401–14.
- Laudanski, P., Charkiewicz, R., Kuzmicki, M., Szamatowicz, J., Charkiewicz, A., Niklinski, J., 2013, MicroRNAs expression profiling of eutopic proliferative endometrium in women with ovarian endometriosis. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(78), 1-7.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., Hatton, C.S., Harris, A.L., 2008, Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, 141, 672-675
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, 1993,75(5), 843-54.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H. ve diğ., 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *EMBO J*, 23, 4051-60.
- Lee, Y.S., Dutta, A., 2009, MicroRNAs in cancer, *Annu Rev Pathol*, 4, 199-227.
- Lewis, S., Menon, U., 2004, Screening for ovarian cancer, *Reviews in Gynaecological Practice*, 4, 156–161.
- Li, Y., Bahassi, E.M., 2013, Biofluid-based circulating tumor molecules as diagnostic tools for use in personalized medicine, *J Mol Biomarkers Diagn*, 5, 57-163.
- Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G., 1991, Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation, *Cancer Res*, 51, 5054-5059.

- Loberg, R.D., Fridman, Y., Pienta, B.A., Keller, E.T., McCauley, L.K., Taichman, R.S., Pienta, K.J., 2004, Detection and isolation of circulating tumor cells in urologic cancers. *Neoplasia*, 6, 302-309
- Lorger, M., Felding-Habermann, B., 2010, Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis, *Am J Pathol* 176, 2958-2971.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., ve diğ., 2005, MicroRNA expression profiles classify human cancers, *Nature*, 435, 834–8.
- Maheswaran, S., Sequist, L.V., Nagrath, S., Ulkus, L., Brannigan, B., Collura, C.V., Insera, E., Diederichs, S., Iafrate, A.J., Bell, D.W., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Irimia, D., Settleman, J., Tompkins, R.G., Lynch, T.J., Toner, M., Haber, D.A., 2008, Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *The New England Journal of Medicine*, 359, 366-377
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., Ford, H.L., 2010, Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 117e134.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., PogosovaAgadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., Tewari, M., 2008, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 10513-10518
- Montagnana, M., Danese, E., Ruzzenente, O., ve diğ, 2011, The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful?, *Clin Chem Lab Med*, 49(3), 521-525.
- Montes, A.F., Gómez, J.G., Viejo, M.N., Bermejo, M.A., Urrutia, S.A., Mata, J.G. 2012, Epidemiology and etiology of ovarian cancer, *Ovarian Cancer – Basic Science Perspective*. ISBN: 978-953-307-812-0.
- Montgomery, S.B., Sammeth, M., Gutierrez- Arcelus, M., Lach, R. P., Ingle, C., Nisbett, J., ve diğ, 2010, Transcriptome genetics using second generation sequencing in a Caucasian population, *Nature*, 464(7289), 773-7.
- Moore, R.G., Brown, A.K., Miller, C.M., Skates, S., Allard, J.W., ve diğ, 2008, The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass, *Gynecologic Oncology*, 108, 402-408.
- Morrison, T., Hurley, J., Garcia, J., Yoder, K., Katz, A., Roberts, D., ve diğ., 2006, Nanoliter high throughput quantitative PCR. *NucleicAcids Res*, 34 , e123–31.
- Moss, E.G., Lee, R.C., Ambros, V., 1997, The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA, *Cell*, 88(5), 637.

- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C., 2010, Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression, *J Cell Sci*, 123, 1603-1611.
- Myers, E.R., Bastian, L.A., Havrilesky, L, ve diğ, 2006, Management of adnexal mass. *Evid. Rep. Technol. Assess.* 130, 1-145.
- Nadal, R., Lorente, J.A., Rosell, R., Serrano, M.J., 2013, Relevance of molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer in the era of targeted therapies. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 13, 295-307
- Nawroz, H., Koch, W., Anker, P., Stroun, M., Sidransky, D., 1996, Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nature Medicine*, 2, 1035-1037
- Nieto, M.A., 2011, The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 347-376.
- Nyugen, 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(2), 171-187.
- Obeidat, B.R., Amarin, Z.O., Latimer, J.A., Crawford, R.A., 2004, Risk of malignancy index in the preoperative evaluation of pelvic masses, *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 85(3), 255–258.
- Obernosterer, G., Martinez, J., Alenius, M., 2007, Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections, *Nat Protoc*, 2, 1508–14.
- Odunsi, K., Wollman, R.M., Ambrosone, C.B., ve diğ, 2005, Detection of epithelial ovarian cancer using <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics, *Int J Cancer*, 113:782–8.
- Ozsolak, F., Poling, L, L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., 2008, Chromatin structure analyses identify miRNA promoters, *Genes Dev*, 22 (22), 3172-3183.
- Park, S.M., Shell, S., Radjabi, A.R., Schickel, R., Feig, C., Boyerinas, B., Dinulescu, D.M., Lengyel, E., Peter, M.E., 2007, Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle*, 6(21), 2585-90.
- Pavese, J.M., Farmer, R.L., Bergan, R.C., 2010, Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein, *Cancer Metastasis Rev*, 29, 465-482.
- Pearce, C.L., Templeman, C., Rossing, M.A., Lee, A., Near, A.M., ve diğ, 2012, Association between endometriosis and risk of histological subtypes of ovarian cancer: a pooled analysis of case–control studies, *Lancet Oncol.*, 13(4), 385–394.
- Persson, H., Kvist A., Rego, N., Staaf, J., Vallon-Christersson J., Luts, L., Loman, N., Jonsson, G., Naya, H., Hoglund, M., Borg, A., Rovira, C., 2011, Identification

of new micrnas in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 Gene, *Cancer Res*, 71(1), 78-86.

Peters, D.G., Kudla, D.M., Deloia, J.A., ve diğ, 2005, Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 1717–23.

Petricoin, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., ve diğ, 2002, Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer, *Lancet*, 359, 572-577.

Plebani, M., 2005, Proteomics: the next revolution in laboratory medicine?, *Clin Chim Acta*, 357, 113-122.

Prat, J., Ribe, A., Gallardo, A., 2005, Hereditary ovarian cancer, *Hum Pathol*, 36, 861–70.

Pucciarelli, S., Rampazzo, E., Briarava, M., Maretto, I., Agostini, M., Digito, M., Keppel, S., Friso, M.L., Lonardi, S., De Paoli, A., Mescoli, C., Nitti, D., De Rossi, A., 2012, Telomere-specific reverse transcriptase (hTERT) and cell-free RNA in plasma as predictors of pathologic tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *Annals of Surgical Oncology Website*, 19, 3089-3096

Qiu, S., Lin, S., Hu, D., Feng, Y., Tan, Y., Peng, Y., 2013, Interactions of miR-323/miR-326/miR-329 and miR-130a/miR-155/miR-210 as prognostic indicators for clinical outcome of glioblastoma patients, *J Transl Med*, 11,10.

Rabinowits, G., Gercel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., Kloecker, G.H., 2009, Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer, *Clin Lung Cancer*, 10, 42-46.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., 2000, The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 403(6772), 901-6.

Resnick, K.E., Alder, H., Hagan, J.P., Richardson, D.L., Croce, C.M., Cohn, D.E., 2009, The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform, *Gynecol Oncol*, 112,55–9.

Roett, M.A., Evans, P., 2009, Ovarian cancer: an overview, *Am Fam Physician*, 80(6), 609-616.

Ross, J.S., Slodkowska, E.A., 2009, Circulating and disseminated tumor cells in the management of breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 132, 237-245

Rossing, M.A., Wicklund, K.G., Cushing- Haugen, K.L., Weiss, N.S., 2010, Predictive value of symptoms for early detection of ovarian cancer, *J. Natl Cancer Inst.*, 102(4), 222–229.

- Roth, C., Pantel, K., Muller, V., Rack, B., Kasimir-Bauer, S., Janni, W., Schwarzenbach, H., 2011, Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer*, 11-4
- Ruby, J.G., Jan, C., Player, C., Axtell, M.J., Lee, W., Nusbaum, C., ve diğ., 2006, Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*, *Cell*, 127, 1193–207.
- Russo, A., Calo, V., Bruno, L., Rizzo, S., Bazan, V., Di Fede G., 2009, Hereditary ovarian cancer, *Crit Rev Oncol Hematol*, 69, 28–44.
- Ryk C, Berggren P, Kumar R, ve diğ., 2005, Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and NAT2 genotypes on the p53 mutational spectrum in bladder tumours, *Int J Cancer*, 113:761-768.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., Enright, A.J., 2007, Genomic analysis of human microRNA transcripts, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 17719-24.
- Salnikov, A.V., Liu, L., Platen, M., Gladkich, J., Salnikova, O., Ryschich, E., Mattern, J., Moldenhauer, G., Werner, J., Schemmer, P., Buchler, M.W., Herr, I., 2012, Hypoxia induces EMT in low and highly aggressive pancreatic tumor cells but only cells with cancer stem cell characteristics acquire pronounced migratory potential, *PLoS One*, 7, 46391.
- Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S., ve diğ., 2008, Realtime PCR quantification of precursor and mature microRNA, *Methods*, 44 , 31–8.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R., 1995, Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain, *PCR Methods Appl*, 4, 234–8.
- Schwarzenbach, H., Muller, V., Milde-Langosch, K., Steinbach, B., Pantel, K., 2011, Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease, *Molecular BioSystems*, 7, 2848-2854
- Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E.M., Leon, S.A., 1983, Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*, 51, 2116-2120
- Sharma. S., 2009, Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines, *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 30, 1-8.
- Shi, R., Chiang, V., 2005, Facile means for quantifying microRNA expression by realtime PCR, *Biotechniques*, 39, 519–25.
- Siegel, R.L.; Kimberly D. Miller; Ahmedin Jemal. 2015, Cancer Statistics, *Ca Cancer J Clin*, 65, 5–29.

- Silva, J.M., Dominguez, G., Villanueva, M.J., Gonzalez, R., Garcia, J.M., Corbacho, C., Provencio, M., Espana, P., Bonilla, F., 1999, Aberrant DNA methylation of the p16INK4a gene in plasma DNA of breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, 80, 1262-1264
- Simpson, R.J., Lim, J.W., Moritz, R.L., Mathivanan, S., 2009, Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential, *Expert Rev Proteomics*, 6, 267-283.
- Siomi, H., Siomi, M.C., 2010, Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals, *Mol Cell*, 38(3), 323-32.
- Skates, S.J., Mai, P., Horick, N.K., ve diğ, 2011, Large prospective study of ovarian cancer screening in high-risk women: CA125 cut-point defined by menopausal status, *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, 4(9), 1401–1408.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T.Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., Breakefield, X.O., 2008, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat Cell Biol*, 10, 1470-1476.
- Soto-Reyes, E., Gonzalez-Barrios, R., Cisneros- Soberanis, F. ve diğ, 2012, Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers, *BMC Cancer*, 12, 40.
- Spratlin, J.L., Serkova, N.J., Eckhardt, S.G., 2009, Clinical applications of metabolomics in oncology: a review, *Clin Cancer Res*, 15, 431–40.
- Spurgeon, S.L., Jones, R.C., Ramakrishnan, R., 2008, High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array, *PLoS One*, 3, 1662–9.
- Strauss, R., Li, Z.Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., Moller, T., Pesonen, S., Hemminki, A., Hamerlik, P., Drescher, C., Urban, N., Bartek, J., Lieber, A., 2011, Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity, *PLoS One* 6, 16186.
- Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F., Rossier, A., Chen, X.Q., Anker, P., 2000, The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000, 906, 161-168
- Szotek, P.P., Pieretti-Vanmarcke, R., Masiakos, P.T., Dinulescu, D.M., Connolly, D., Foster, R., Dombkowski, D., Preffer, F., Maclaughlin, D.T., Donahoe, P.K., 2006, Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 11154-11159
- Taylor, D.D., Gercel-Taylor, C., 2008, MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110, 13-21
- Tekkeşin, N., 2014, Over Kanserinde Tanıyı Kolaylaştıran Yeni Belirteçler: OVA1 ve ROMA. *Türk Klinik Biyokimya Derg*; 12(1), 57-63.



- Thakur, B.K., Zhang, H., Becker, A., Matei, I., Huang, Y., ve diğ., 2014, Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection, *Cell Res*, 24, 766-769.
- The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma, *Nature*, 474(7353), 609–615.
- Thomsen, R., Nielsen, P.S., Jensen, T.H., 2005, Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes, *RNA*, 11, 1745–8.
- Tirino, V., Desiderio V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., Papaccio, G., 2013, Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal*, 27, 13-24
- Tomaskovic-Crook, E., Thompson, E.W., Thiery, J.P. 2009, Epithelial to mesenchymal transition and breast cancer, *Breast Cancer Res*, 11, 213.
- Tveito, S., Andersen, K., Karesen, R., Fodstad, O., 2011, Analysis of EpCAM positive cells isolated from sentinel lymph nodes of breast cancer patients identifies subpopulations of cells with distinct transcription profiles. *Breast Cancer Research*, 13, R75
- Ueland, F.R., Desimone, C.P., Seamon, L.G., ve diğ., 2011, Effectiveness of a multivariate index assay in the preoperative assessment of ovarian tumors, *Obstet Gynecol*, 117(6), 1289-1297.
- Válóczy, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyán, J., Kauppinen, S., Havelda, Z., 2004, Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Res*, 32, e175–82.
- van Schooneveld, E., Wouters, M.C., Van der Auwera, I., Peeters, D.J., Wildiers, H., Van Dam, P.A., Vergote, I., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., Van Laere, S.J., 2012, Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers, *Breast Cancer Res*, 14, R34.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., Remaley, A.T., 2011, MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins, *Nat Cell Biol*, 13, 423-433.
- Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R., 2012, Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials, *Biochim Biophys Acta*, 1820,940-948.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., ve diğ., 2006, A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2257–61.
- Vona, G., Sabile, A., Louha, M., Sitruk, V., Romana, S., Schutze, K., Capron, F., Franco, D., Pazzagli, M., Vekemans, M., Lacour, B., Brechot, C., Paterlini-

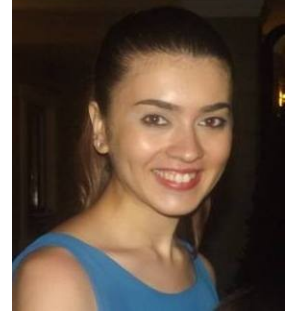
- Brecht, P., 2000, Isolation by size of epithelial tumor cells: a new method for the immunomorphological and molecular characterization of circulating tumor cells. *American Journal of Pathology*, 156, 57-63
- Wienholds, E., Kloosterman, W.P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., ve diğ., 2005, MicroRNA expression in zebrafish embryonic development, *Science*, 309, 310–1.
- Wightman. B., Bürglin, T.R., Gatto, J., Arasu, P., ve diğ, 1991, Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development, *Genes Dev*, 5(10), 1813-24.
- Williams, S.C., 2013, Circulating tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 4861
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., Diederichs, S., 2009, Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation, *Nature Cell Biology*, 11, 228-234.
- Wu, D., Hu, Y., Tong, S., Williams, B.R.G., Smyth, G.K., Gantier, M.P., 2013, The use of miRNA microarrays for the analysis of cancer samples with global miRNA decrease, *RNA*, 19, 876–888.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., ve diğ., 2006, Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Cell*, 9:189–98.
- Yu, M., Stott, S., Toner, M., Maheswaran, S., Haber, D.A., 2011, Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *The Journal of Cell Biology*, 192, 373-382
- Yurkovetsky, Z.R., Linkov, F.Y., E.M., D., Lokshin, A.E., 2006, Multiple biomarker panels for early detection of ovarian cancer, *Future Oncol*, 2, 733–41.
- Zeng, Y., Yi, R., Cullen, B.R., 2005, Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha, *EMBO J*, 24, 138-148.
- Zhang, B., Barekati, Z., Kohler, C., ve diğ, 2010, Proteomics and biomarkers for ovarian cancer diagnosis, *Ann Clin Lab Sci.*, 40, 218-225.
- Zhang, B., Cai, F.F., Zhong, X.Y., 2011, An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2(158), 119 – 123.
- Zhang, L., ve diğ, 2006, microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103,9136–9141.
- Zhang, L., Volinia, S., Bonome, T., Calin, G.A., Greshock, J., ve diğ, 2008, Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(19), 7004-9.

Zhang, Z., Bast Jr, R.C., Yu, Y., ve diğ, 2004, Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer, *Cancer Res* 64, 5882–90.

Zhou, J., Shi, Y.H., Fan, J., 2012, Circulating cell-free nucleic acids: promising biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Seminars in Oncology*, 39, 440-448



## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	ECE GÜMÜŞOĞLU
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	18.10.1991, KDZ.EREĞLİ
Telefon	05392142196
E-mail	ece.gumusoglu@istanbul.edu.tr

### Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2013-
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2009-2013
Lise	Zonguldak Alaplı Anadolu Lisesi	2005-2009

### Makaleler / Bildiriler

<p><b>Makale</b></p> <p>Gunel, T., Gumusoglu, E., Hosseini, M.K., Yilmazyildirim, E., Dolekcap, I., Aydinli, K., 2014, Effect of angiotensin I-converting enzyme and <math>\alpha</math>-actinin-3 gene polymorphisms on sport performance, Molecular medicine reports, 9(4),1422-6.</p> <p>Gunel, T., Hosseini, M.K., Gumusoglu, E., Dolekcap, İ., Aydinli, K., 2014, Future perspective of preeclampsia by miRNA , Global journal of human genetics &amp;</p>
---

Gene Therapy, 2, 53-67.

Gunel, T., Hosseini, M.K., Gumusoglu, E., Zeybek, G., Dolekcap, I., Kalelioglu, I., Benian, A., Ermiş, H., Aydinli, K., 2014, Current Approaches On Non-Invasive Prenatal Diagnosis: Prenatal Genomics, Transcriptomics, Personalized Fetal Diagnosis. Turkish journal of obstetrics and gynecology, 4, 233-41.

**Bildiri:**

Gunel, T., Hosseini, M.K., Gumusoglu, E., Dolekcap, I., Kisakesen, I., Ermis, H., Benian, A., Aydinli, K., 2014, Maternal plasma and placenta miRNAs expression profiling of preeclamptic pregnancies by microarray. The 2014 Pregnancy Summit, 6th -8th October 2014, London, UK.

Hosseini, M.K., Gunel, T., Gumusoglu, E., Ermis, H., Benian, A., Dolekcap, I., Aydinli, K., 2014, MicroRNA profiling in miscarriage patients. International Journal of Molecular Medicine; Volume 34, supplement 1 . The 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, 9-11 October 2014. Athens, Greece.

Gumusoglu, E., Gunel, T., 2013, Relationship with ACTN3 gene polymorphisms and sport performance. Istanbul University