

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA pre-miR-423 ve pre-miR-608
GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Harika TOPAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurcan ARAS

MERSİN – 2014

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARDA pre-miR-423 ve pre-miR-608
GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Harika TOPAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurcan ARAS

Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-SBE
TTB (HT) 2012-4 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

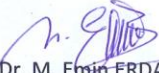
Tez No: 248

MERSİN – 2014

Kabul ve Onay
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

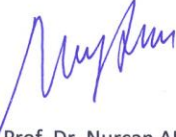
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Kolonorektal Kanseri Hastalarda pre-miR-423 ve pre-miR-608 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/ 03/ 2013


Prof. Dr. M. Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Nurcan ARAS

Jüri Başkanı 
Prof. Dr. Tahsin ÇOLAK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez , Enstitü Yönetim Kurulunun 05/03/2014 tarih ve 2014/105 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini, anlayışını ve emeklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nurcan ARAS'a ,

Yüksek lisans eğitim sürecinde akademik katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a ve anabilim dalımız değerli hocalarına; Kolorektal Kanseri tanısı almış bireylerden kan örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmamıza destek veren Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. Tahsin ÇOLAK'a ve Yrd. Doç. Dr. M. Özgür TÜRKMENOĞLU' na; Deney sonuçlarımın istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve katkılarını sunan Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Didem DERİCİ YILMAZ'a; Tezimin hazırlanmasında yardımlarını eksik etmeyen Arş. Gör. Badel ARSLAN MAMUR, Arş. Gör. Ümit KARAKAŞ ve birbirinden değerli çalışma arkadaşlarıma,

Doğru ve mutlu bir insan olmam için emek veren, sevgileri ve destekleriyle her zaman yanımda olan canım annem ve babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
Kabul ve Onay	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kolorektal Karsinom.....	4
2.2 Genetik Faktörler	5
2.2.1.Tümör Supresör Genlerdeki Değişimler.....	6
2.2.1.1. Adenomatöz polipozis Geni (APC).....	7
2.2.1.2. DCC Geni (Deleted in Colorectal Cancer).....	8
2.1.1.2. p53 Geni.....	9
2.2.2. Protoonkogenlerin Aktivasyonu	9
2.2.2.1. Ras Onkogeni.....	9
2.2.3. DNA Onarım Genlerindeki Değişiklikler (Mismatch Repair Gens)	10
2.3. Kalıtsal Kolorektal Kanser Sendromları	11
2.3.1. Familyal Adenomatöz Polipozisler (FAP).....	11
2.3.2. Gardner Sendromu :.....	12

2.3.3.Turcot Sendromu :	12
2.3.4.Familyal Hamartomatöz Polipozis.....	12
2.3.5.Peutz-Jeghers Sendromu:.....	13
2.3.6.Cowden Sendromu (Multipl Hamartoma Sendromu):.....	13
2.3.7.Bannayan-Riley-Ruvalacaba Sendromu (BRRS):.....	13
2.3.8.Cronkhite-Canada Sendromu:.....	14
2.3.9.Kalıtsal (Hereditör) Non-polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC).....	14
2.4.MikroRNA	15
2.4.1.miRNA'ların Tarihsel Gelişimi	16
2.4.2.MikroRNA Oluşum Basamakları	16
2.4.2.1.miRNA Transkripsiyonu ve pri-miRNA Oluşumu	17
2.4.2.2.pri-miRNA'dan pre-miRNA Oluşumu	17
2.4.2.3.miRNA Oluşumu	18
2.5.miRNA ile Hedef mRNA Arasındaki Etkileşimi.....	19
2.6.miRNA'ların Kanser İlişkisi	21
2.6.1.Tümör Supresör miRNA'lar.....	21
2.6.2.Onkogen miRNA'lar.....	22
2.7.Kolorektal Kanserde MikroRNA'nın Rolü:.....	23
2.8.miRNA Oluşum Yoluyla İlişkili Polimorfizmler.....	24
2.9. pre-miR-423 rs6505162 (A/C).....	25
2.10. pre-miR-608 rs4919510 (C/G).....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	28
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.1.3. DNA İzolasyonu	30

3.1.4. DNA İzolasyonunda İzlenen Yol.....	31
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	32
3.3. Pre-miR-423 Geninde rs6505162 Gen Polimorfizmi (A/C) ile pre-miR608 Geninde rs4919510 (C/G) Gen Polimorfizminin Belirlenmesi	32
3.3.1. Pre-miR-423 geninin rs6505162 SNP bölgesi ile pre-miR608 geninin rs4919510 SNP bölgesinin özgül primerlerle amplifikasyonu	32
3.3.2. SNP Özellikleri	33
3.3.2.1. Real Time-PCR reaksiyon ortamının hazırlanması	34
3.4. İstatistiksel Analiz.....	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. KRK Görülme Oranlarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı	36
4.2 <i>pre-miR-423</i> (A/C) rs6505162 Gen Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı ve KRK ile İlişkisi	37
4.3. <i>pre-miR-608</i> (C/G) rs4919510 Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı ve KRK İle İlişkisi.....	40
4.4 KRK Gelişiminde <i>pre-miR-423</i> ve <i>pre-miR-608</i> Genlerinin Ortak Etkisi	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
7. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kolona yakın lenf düğümleri.....	4
Şekil 2.2: Kolon Kanser Gelişiminin Moleküler Temeli	11
Şekil 2.3: miRNA Biyogenezi.....	19
Şekil 2.4 : miRNA-mRNA komplementerliği	20
Şekil 2.5: Pre-miR-423 (rs6505162) Geninin Kromozomal Lokalizasyonu.....	26
Şekil 2.6: pre-miR-608 (rs4919510) Geninin Kromozomal Lokalizasyonu	27
Şekil 4.1. pre-miR-423 A/C (rs6505162) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile KKK'li Hasta Grubu Arasındaki Dağılımı.....	39
Şekil 4.2. pre-miR-423 A/C (rs6505162) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile KKK Hasta Grubu Arasındaki Dağılım	39
Şekil 4.3. pre-miR-608 C/G (rs4919510) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile KKK Hasta Grubu Arasındaki Dağılımı	41
Şekil 4.4. pre-miR-608 C/G (rs4919510) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile KKK Hasta Grubu Arasındaki Dağılım	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1: pre-miR-423 ve pre-miR-608 genlerine ait primerler	33
Çizelge.3.2 pre-miR-423 genine ait rs6505162	33
Çizelge.3.3 pre-miR-608 genine ait rs4919510	34
Çizelge 3.4: Real Time PCR şartları, kullanılan malzemeler ve miktarları	35
Çizelge 4.1 KRK hasta ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet dağılımı	36
Çizelge 4.2 Hardy Weinberg Denge Kontrolü (pre-miR-423)	37
Çizelge 4.3 pre-miR-423 (rs6505162) Polimorfizmi Genotip ve Alel Oranlarının Hasta ve Kontrol Grubu Arasındaki Dağılımı (N: alel ve genotip sayısı)	38
Çizelge 4.4 Hardy Weinberg Denge Kontrolü (pre-miR-608)	40
Çizelge 4.5 pre-miR-608 (rs4919510) Polimorfizmi Genotip ve Alel Oranlarının Hasta ve Kontrol Grubu Arasındaki Dağılımı	41
Çizelge 4.6: pre-miR genotip sıklıkları ile kolorektal kanser gelişme riski arasındaki ilişki	43
Çizelge.5.1. Yapılan Çalışmalarda pre-miR-423 ve pre-miR-608 Gen Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanser ve Diğer Kanserlerle İlişkisi	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin Bazı
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ACDC	: Adiponectin and Collagen Domain Containing
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
BIC	: B Hücre İntegrasyon Sınıfı
BRRS	: Bannayan Riley Ruvalacaba Sendromu
C	: Sitozin Bazı
DCC	: Kolorektal Kanserde Delesyon Geni
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FAP	: Familial (Ailesel) adenomatoz polipozis
FAM	: 6-carboxyflurescein
G	: Guanozin Bazı
GHR	: Büyüme Hormon Reseptörü
gr	: Gram
HNPCC	: Hereditör Nonpolipozis Colorectal Cancer
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KRAS	: Kirsten RAS
KRK	: Kolorektal kanser
LOH	: Heterosite Kaybı
M	: Molarite
miRNA	: MikroRNA
ml	: Mililitre
MMR	: Yanlış Eşleşme Tamiri
MSI	: Mikrosatellit İnstabilite

N	: Birey sayısı
NaCl	: Sodyum Klorür
NSRP1	: Nuclear Speckle Splicing Regulator Protein
NRAS	: Nöroblastom RAS
onko-miR	: Onkogen miRNA
OR	: Odds Ratio
PJS	: Peutz Jeghers Sendromu
pre-miRNA	: Preküsör (öncül) miRNA
pri-miRNA	: Prior (ilk) miRNA
Real Time PCR	: Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SNP	: Tek bir nükleotid polimorfizmi
TGF-β	: Tümör Growth Faktörü beta
TS-miR	: Tümör Supressör miRNA
μl	: Mikrolitre

ÖZET

Kolorektal Kanserli Hastalarda pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması

Kolorektal kanser (KRK) patogeneğinde, miRNA'ların işlenmesi ve olgunlaşmasında rol oynayan pre-miRNA'lardaki polimorfizmlerin etkili olduğu düşünülmektedir. pre-miRNA genlerindeki SNP'ler olgun mi-RNA oluşumunu ve ekspresyonunu etkilediği gibi aynı zamanda kanserin gelişiminden ve klinik bulgularından sorumlu olabilir. Bu çalışmada Türk populasyonu için Mersin örnekleminde pre-miR-423 ve pre-miR-608 gen polimorfizmlerinin KRK ile ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmaya, kontrol grubundan yaş ortalaması 52,6 olan 100 sağlıklı birey ile KRK grubundan yaş ortalaması 56,89 olan 100 birey dahil edilmiştir. Kontrol ve hasta grubundaki bireylerden alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmış ve genotipler Real-Time PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri 'ki-kare trend' testleri ile incelenmiştir. Yapılan genotip ve allel dağılımları değerlendirmeleri sonucunda; pre-miR-423 A/C polimorfizmi için KRK hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p=0,039$). Hastalarda CC genotip sıklığı kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir ve CC genotipinin 1.9 oranında kolorektal kanser olma riskini arttırdığı saptanmıştır (OR=1,935 , (1,031 -3,632), $p=0,040$). pre-miR-608 C/G polimorfizmi için ise; hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,395$). Bu araştırma, şu ana kadar pre-miR-423 ve pre-miR-608 SNP'lerinin KRK ile olan olası ilişkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Daha geniş çaplı başka bir çalışmada, bulguların tekrarlanması sonuçların doğrulanması açısından önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, pre-miRNA, Polimorfizm

ABSTRACT

The Investigation of pre-miR-423 (rs6505162) and pre-miR-608 (rs4919510) Gene Polymorphisms with Colorectal Cancer Patients

It has been thought that the polymorphism of pre-miRNAs acting process and maturation of miRNA effect the pathogenesis of colorectal cancers (CRC). SNPs in pre-miRNA genes only effect on expression and formation of mature mi-RNA but also it responsible for clinical findings and development of cancer. In this study was aimed to investigate in the Turkish population to Mersin sample pre-miR-423 and pre-miR-608 gene polymorphisms in relation with CRC. The study includes the average age is 52,6 of 100 healthy individuals and the average age 56,89 of 100 individuals taking colorectal cancer diagnosis as patient group. The molecular analysis of the blood samples which have taken from both experimental and healthy group, was performed by Real-Time PCR method. Diseases of the relationship between genotypes and alleles were examined by chi-square trend test. As a result of making the genotype and allele distributions; significant differences in the pre-miR-423 A/C gene polymorphism, in terms of genotype distribution between the CRC patients and control group were statistically determined ($p=0.039$). The frequency of CC genotype in patients is more than compared to the control group and CC genotype was found 1.9 percent increase the risk of colorectal cancer ($OR=1,935$, $(1,031-3,632)$, $p=0,040$). For the pre-miR-608 C/G gene polymorphism, in terms of genotype distribution there was no statistically significant difference between the CRC patients and control group ($p=0,395$). This study is the first study evaluating the possible relationship between pre-miR-423 and pre-miR-608 SNPs with CRC until now. A large scale study from other center is important in order to repeat verification of results.

Key words: Colorectal Cancer, pre-miRNA, Polymorphism.

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser (KRK) gelişmiş ülkelerde sıklıkla görülen ve ölüme yol açan önemli bir hastalıktır (1). Dünya genelinde KRK erkeklerde 3. bayanlarda ise 2. yaygın kanserler arasındadır. Yılda 1.2 milyon kişi bu hastalığa yakalanırken 600.000 kişi bu hastalıktan ölmektedir. Kolorektal kanser insidansı, gelişmiş ülkeler olan Batı Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya'da yüksek oranda görülmektedir. Son yıllarda, Doğu Asya ve Doğu Avrupa gibi KRK riski düşük olan ülkelerde de hızla artmaktadır (2). Özellikle Çin'de, kolorektal kanser görülme oranında ve ölümlerde artış gözlemlenmektedir (3). Ülkemizde ise en sık görülen 10 kanser sıralamasında 7. sırada olup, yılda yaklaşık 5000 yeni vaka görülmekte ve yaklaşık 3200 kolorektal kansere bağlı ölüm gerçekleşmektedir (4).

KRK hastalığının oluşumunda, yaşam tarzı, beslenme faktörleri, yaş ve aile hikayesi en önemli risk faktörleri arasındadır (5). Bu hastaların % 90'ından fazlası 40 yaşın üzerinde olan kişiler olup bu yaştan sonra risk, her 10 yılda ikiye katlanmaktadır. Ülseratif kolit, ailevi polipozis veya ailevi kanser sendromları gibi genetik yatkınlık durumlarında kanser daha erken yaşlarda gözlenir ve prognozu daha şiddetlidir. Şişmanlık, yağdan ve kalori açısından zengin, posadan fakir diyetle beslenme ve sigara içmenin risk faktörünü arttırdığı gözlenmiştir. Sigara içimi ayrıca adenomatöz polip ve yüksek riskli polip gelişimi için de risk faktörüdür (4).

Kolorektal karsinogenezin gelişimde, 'Kromozomal İnstabilite' ve 'Mikrosatellit İnstabilite' olmak üzere 2 moleküler yolak rol almaktadır (6). Hastalığın moleküler patogenezinin aydınlatılmasında protein kodlamayan ve genlerin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen miRNA molekülleri tanımlanmıştır (7).

İnsanlarda miRNA'ların prevalansı ve önemi son yıllarda tanımlandığı için, miRNA'lar ve onların hedef bölgeleri ile ilişkili insan polimorfizmlerini gösteren kısıtlı sayıda çalışma vardır (8). Çalışmalarda farklı sayısal yaklaşımlar ile genomdaki tahmini miRNA hedef bölgeleri geliştirilmiş ve bu tahmini hedef bölgelerinin küçük bir kısmı deneysel olarak kanıtlanmıştır. İnsan miRNA'ları başlangıçta prekürsör miRNA(pre-miRNA) olarak transkribe edilmekte ve pre-miRNA daha sonra bir takım işlemlerden geçerek olgun miRNA'ları oluşturmaktadır (9). miRNA'ların olgunlaşması en az 2

aşamada gerçekleşmektedir. Önce birkaç yüz nükleotid dizisinde oluşan pri-miRNA olarak transkribe olurlar. Daha sonra, yaklaşık 70 nükleotid dizisinde meydana gelen ve kıvrımlı bir yapı oluşturacak şekilde pre-miRNA olarak adlandırılan yapısal değişime uğrarlar. Genomda pre-miRNA dizilerinin korunmuş olması, bu biyolojik sistemin önemini göstermektedir. pre-miRNA ve olgun miRNA polimorfizmi miRNA'nın etkin olduğu süreçler ve hedef seçimini etkileyerek çeşitli biyolojik olayları modifiye etmektedir. miRNA ekspresyonu ve buna bağlı olarak serum miRNA konsantrasyonu tümörler arasında belirgin farklılık gösterir. miRNA'lar kolorektal kanser patogenezinde rol alan birçok onkogenik ve tümör süpresör yolun düzenlenmesinde işlev görürler. KRK gelişmesinde etkili olan sinyal yollarındaki proteinler (Wnt/ beta katenin, fosfotidilinositol-3 kinaz yolağı, KRAS, p53 gibi) miRNA regülasyonundan etkilenmektedir (10). Wnt/beta katenin yolağı erken kolorektal tümör gelişiminde önemli role sahiptir. Kolorektal karsinogenezin başlamasında en önemli olay olan APC genin mutasyona uğraması, kolorektal adenoma ve karsinomların %60'ında saptanmakta ve bu da Wnt/beta katenin yolunun aktivitesine yol açmaktadır (11).

miRNA genlerindeki SNP'ler olgun mi-RNA oluşumunu ve ekspresyonunu etkilediği gibi aynı zamanda kanserin gelişiminden ve klinik bulgularından sorumlu olabilir. miRNA'ların anormal ekspresyonları, KRK'nın tümörögenезis ile prognozunda biyomarker ve fonksiyonel düzenleyici olarak işlev gördüğü gözlemlenmiştir (12). Aynı şekilde birçok yeni çalışma pri-miRNA'lardaki ve miRNA bağlanma bölgelerindeki SNP'lerin KRK olma riski ve hastalığın ilerlemesi ile ilgili olduğunu göstermiştir. Ayrıca Hu ve arkadaşları (13) yaklaşık 400 insan pre-miRNA'ları ve bunların çevresindeki bölgelerdeki genleri taradıklarında, pre-miRNA genlerindeki SNP'lerin çevresindeki bölgeye kıyasla daha az sayıda olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu da pre-miRNA'ların son derece iyi korunmuş ve işlevsel olabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda pre-miR-423 rs6505162 ve pre-miR-608 rs4919510 SNP bölgeleri kolorektal karsinomla ilişkili olduğu bulunmuştur (13-17).

pre-miR-423, insan genomunda kromozom 17q11.2' de lokalizedir. mRNA'ların alternatif kesimlerini içeren NSRP1(Nuclear Speckle Splicing Regulatory Protein) geninin ilk intronunda yer alır (14). miR423 ten gelişen olgun miRNA'ların değişen ekspresyonu baş-boyun kanseri, meme kanseri ve kolorektal kanser gibi birçok multiple kanser tipleri ile rapor edilmiştir (13-15).

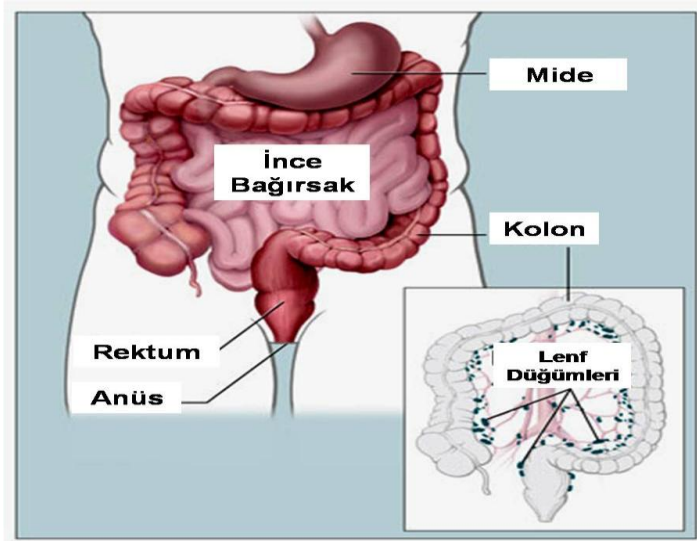
Tümör supressör miRNA olduğu düşünölen miR608, kromozom 10q24'de lokalizedir ve fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. 25bp olan sekansın 22 bp'ı olgun miRNA'yı oluşturur (14). miR608 rs4919510 olmak üzere tek SNP bölgesi içerir. C-G polimorfizmi birçok popülasyonda yaygındır. Prelokusundaki heterozigot kaybının kolorektal, prostat, pankreatik ve beyin gibi birçok insan kanserlerine sebep olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda miR-608 gen bölgesindeki rs4919510 SNP hedeflerinin BCL-XL, SEPT9 ve CDK olduğu düşünölmektedir (16). miR-608'in hedef bölgelerinin değışmesi KRK hücre gelişmesiyle doğrudan ilişkilendirilebilir. Xing ve ark.'larının (17) Çin popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada, kolorektal kanser tanısı konmuş hastalarda 10 farklı pre-miRNA SNP bölgesini tarayarak pre-miR-423 ve pre-miR-608 olmak üzere 2 farklı pre-miRNA bölgesinin kolorektal kanser gelişiminde etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada Afroamerikalarda kolorektal kanser tanısı konmuş hastalarda pre-miR-608 rs4919510 SNP bölgesinin kolorektal kanseri gelişiminde risk faktörü olmadığı sonucunu ortaya koymuşlardır (18).

Bu çalışmanın amacı, kolorektal kanserli hastalarda, pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) gen polimorfizmleri ile kolorektal kanser gelişimi arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaktır. pre-miRNA genlerindeki SNP'lerin kanserle ilişkisi konusunda literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma Türk toplumunda kolorektal kanser ile pre-miR-423 ve pre-miR-608 gen polimorfizminin araştırılması konusunda ilk çalışma olacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kolorektal Karsinom

Kolorektal kanser (KRK) , sindirim sisteminin bir bölümünü oluşturan kalın barsakta meydana gelen kanserlerdir. Kalın bağırsak, kolon ve rektum olarak adlandırılan iki kısımdan oluşur. Bu bölgelerden kolon kısmı kalın bağırsağın büyük bir bölümüne denk gelirken, rektum kısmı anüsten önceki yaklaşık 10 cm'lik kısımdır. Kanser, rektumda görülürse rektum kanseri; kolonun diğer kısımlarında görülürse kolon kanseri olarak adlandırılır (19). Kolorektal kanser gelişikten sonra kalın bağırsağa yakın olan lenf düğümlerine yerleşip metastaz yapabilir.



Şekil 2.1 Kolona yakın lenf düğümleri (20)

Kolorektal kanserin temel nedeni, kolon ve rektumu oluşturan hücrelerde kontrolsüz çoğalmanın meydana gelmesidir. Kolorektal kanserlerin çoğu kanser öncüsü sayılan polip zemininden gelişir. Polipler, kolon ve rektumun iç yüzeyini döşeyen hücrelerden oluşurlar ve genellikle yakınmaya neden olmazlar ancak kanserleşme eğilimi gösterirlerse çeşitli yakınmalara neden olurlar (21).

KRK tüm dünyada 3. sıklıkta görülen kanser olup ortalama her yıl yaklaşık bir milyon kolorektal kanser tanısı konulurken, 500.000 hasta KRK nedeniyle kaybedilmektedir (4). Türkiye’de Sağlık Bakanlığı’nın 2007-2008 yıllarında on iki ildeki kanser kayıt merkezi verilerine göre, KRK görülme sıklığı açısından tüm kanserler içinde % 7,8 ile kadınlarda üçüncü ve % 7,5 ile erkeklerde dördüncü sırada yer almaktadır (22).

KRK görülme sıklığı, gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre daha yüksektir. Asya ve Afrika’da sıklık batıya oranda daha düşüktür. Ancak doğu Avrupa ve Japonya’da son yıllarda belirgin artış gözlenmektedir. Amerika’da ise sıklık ve mortalite oranlarının zencilerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (23).

Yaş, sporadik KRK için major risk faktörüdür. Kolorektal kanser görülme sıklığı 40-45 yaşından itibaren artar. Her 10 yılda ikiye katlanarak 75 yaş civarında en yüksek düzeyine ulaşır. Ülseratif kolit, ailevi polipozis veya ailevi kanser sendromları gibi genetik yatkınlık durumlarında kanser daha erken yaşlarda gözlenir ve prognozu daha şiddetlidir (5).

Şişmanlık, yağdan ve kalori açısından zengin, posadan fakir diyetle beslenme ve sigara içmenin risk faktörünü arttırdığı gözlenmiştir. Sigara içimi ayrıca adenomatöz polip ve yüksek riskli polip gelişimi için de risk faktörüdür (23).

Kolorektal kanserler yaklaşık %5 oranında kalıtsal, %95 oranında sporadik olarak ortaya çıkar. Bu kanserlerin etyolojisinde genetik faktörler, çevresel faktörler ve prekanseröz hastalıklar rol oynamaktadır (24).

2.2 Genetik Faktörler

Kolorektal kanserlerin ortaya çıkışında genetik değişiklikler önemli rol oynamaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda kolon kanseri bir seri somatik mutasyon sonucunda gelişir ve bu mutasyonlar, gerçekleştikleri genler ve birikim mekanizmaları sonucunda farklılık gösterirler (6). Kolorektal kanser normal dokuda büyümeyi kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik değişikliklerin birikimi sonucunda oluşmaktadır. Karsinogenezde ilk değişiklikler hücre büyümesi ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) arasındaki normal dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemelerle tesbit edilemeyen oldukça hassas olaylardır. Epitel hücrelerinin neoplazik sürece girmesi için gerekli olan genetik değişimler temelde

birbirinden farklı olan iki mekanizma ile açıklanmıştır (25). Bunlardan biri allelik kayıplar ve anoploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklar (Genomik instabilite), diğeri de bazı karmaşık DNA mutasyonları ve diploidinin artması ile kendisini gösteren değişikliklerdir (Mikrosatellit İnstabilite-MSI). Genomik kararsızlık yeterince mutasyona uğramış bir hücrenin kanser hücresine dönüşümüne müsait bir durum oluşturarak adenom ve karsinomların oluşumunda önemli rol oynar (26). Ayrıca KRK'in moleküler patogenezinin aydınlatılmasında protein kodlamayan, ancak protein kodlayan genlerin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen miRNA molekülleri de tanımlanmıştır (7).

Kolorektal kanser gelişimine sebep olan genetik değişiklikler üç temel grupta incelenebilir:

- 1- Tümör supresör gen aktivitesinin azalması veya kaybolması.
- 2- Protoonkogenlerde oluşan değişiklikler.
- 3- DNA onarımı (mismatch repair) ile ilgili genlerdeki değişiklikler

2.2.1.Tümör Supresör Genlerdeki Değişimler

Tümör supresör genler ancak her iki allel gende mutasyon veya kayıp oluştuğunda aktivitelerini kaybetmekte ve hücrenin programlanmış ölümü olan apoptoz engellenmektedir. Bir tümör süpresör gen olan APC geninin (Adenomatous polyposis coli) inaktivasyonu ile başlayan bu yol kolorektal kanserlerin yaklaşık %70- 80' nin patogenezinde rol oynamaktadır ve heterozigozite kaybı olarak adlandırılır (Loss of heterozygosity-LOH).

APC geni fonksiyonunun kaybı displazik aberan kriptomada olarak tanımlanan ilk adenomatoz değişikliklerin oluşumuna yol açar. Daha sonra bir dizi başka genetik değişikliklerin de eklenmesiyle değişik derecede displazi gösterebilen orta ve geç dönemdeki adenom ve sonuçta karsinom oluşur (7).

2.2.1.1. Adenomatöz polipozis Geni (APC)

Famlyal adenomatoz polipozisli (FAP) hastalarda 5. kromozomun 5q21 bölgesinde oluşan delesyon bu kromozomun uzun kolundaki APC geninin tanımlanmasına yol açmıştır. APC geninin ürünü olan APC proteini, 2843 aminoasitten oluşmaktadır ve yaklaşık 310 kD molekül ağırlığına sahiptir. APC geni mutasyonunun kolorektal karsinogenezin erken dönemlerinde olduğu düşünülmektedir (27). APC geni mutasyonu kolorektal kanserin öncü lezyonu olarak kabul edilen aberran kript odaklarıyla karakterize mikroskopik adenomlarda gösterilmiştir. APC gen mutasyonuna bağlı FAP'da klasik görünüm kolonların yüzlerce bazen binlerce poliple kaplanmış olmasıdır. Kolon kanserinin öncü lezyonu polipler olduğundan bunların bir ya da bir kaçından kanser gelişme olasılığı çok yüksektir ve APC gen mutasyonu taşıyan bireylerde profilaktik olarak kolonlar çıkarılmadığı takdirde kanser riski %100'e yaklaşmaktadır (7).

APC, hücrede birçok biyomolekül ile etkileşim halinde bulunmaktadır. Bu özelliği nedeniyle "multidomain" bir proteindir. Birçok bağlanma bölgesi içeren bu proteinin Wnt/ β -katenin sinyal yolunda görev alan β -katenin ve yıkıcı kompleksi oluşturan GSK3 β enzimi ile Axin proteinine bağlandığı belirlenmiştir (28). APC proteininin Axin proteinine bağlandığı bölge "serin-alanin-metionin-prolin" aminoasitlerinden oluşmuştur ve bu bölgeye kısaca "SAMP domaini" adı verilmiştir. APC proteini, yapısında 3 adet korunmuş SAMP tekrarı içerir ve bu tekrar bölgeleri mutasyonlara oldukça açık bir konumda bulunmaktadır. Bu bölgede oluşan mutasyonların "Axin-APC" etkileşimini ortadan kaldırdığı ve bu durumun da sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (29). APC geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu sentezlenen bozuk APC proteinine β -katenin bağlanamaz. Böylece sinyal yolu inaktif durumda olmasına rağmen yıkıcı kompleks dağılarak inhibe olur ve bunun sonucunda da β -kateninin sitoplazmadaki miktarında artış meydana gelir. Sitoplazmada miktarı artan β -katenin çekirdeğe girerek hedef genlerin kontrolsüz transkripsiyonuna neden olur (30). Sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonu ile sitoplazmada birikerek çekirdeğe giren β -katenin proteini ile sitoplazmadan çekirdeğe giren APC proteininin birleşerek birlikte tekrar sitoplazmaya taşındığı hipotezi öne sürülmektedir (31). Böylece APC tarafından β -katenin proteininin

fazlası çekirdekten dışarı çıkarıldığı için bu sinyal yolunun hedef aldığı genlerin kontrolsüz transkripsiyonunun da önlenmediği bildirilmektedir (30). APC proteininin, Wnt/ β -katenin sinyal yolunda üstlendiği görevlerin yanı sıra in vitro koşullarda sitoplazmadaki hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüllere bağlandığı ve tübülün polimerizasyonunu uyardığı gözlenmiştir. Ayrıca embriyonik kök hücrelerle yapılan deneylerde APC proteininin mitotik iğiplikleri ve kinetokorlar ile ilişkili olduğu ve bu proteinin fonksiyon kaybıyla sonuçlanan mutasyonlarda, kromozomların ayrılmasında da çeşitli bozukluklar meydana geldiği ifade edilmiştir (32). APC'nin ayrıca nörogenez ve ostogenezde de önemli roller üstlendiği bildirilmiştir (33).

Tümör baskılayıcı bir gen olan APC geninin mutasyon sonucu hastalık oluşturabilmesi için her iki allele de bozukluk olması gerektiği ifade edilmektedir (34). Bu mutasyonlar sonucu APC proteini işlev yapamadığı için yıkıcı kompleksin β -katenin'i fosforilleme etkisi ortadan kalkmakta ve sinyal yolunun kontrolsüz aktivasyonu gerçekleşmektedir. Böylece Erken adenom evresine geçilmiş olunur.

2.2.1.2. DCC Geni (Deleted in Colorectal Cancer)

DCC, bir tümör süpresör gen olup hepatik metastazları olan kolorektal kanserlerin hemen hepsinde tespit edilmiştir (35). Kromozom 18q21' de heterozigot gen kaybı sonucu adenomlara dönüşüm olur. Bu mutasyonun saptanması 2 ve 3. evredeki kolorektal kanserlerde kötü prognozun oldukça kuvvetli bir belirleyicisidir.

Aynı kromozomun değişik bir bölgesinde yerleşim gösteren ve tümör süpresör özellikte olan SMAD2 ve SMAD4 genleri de heterozigot gen kaybı sonucu kolorektal karsinomda etkisini gösterirler. Bu genler normal hücre büyümesini baskılayıp kontrol altında tutan TGF- β (Transforming growth factor beta) ara yolunda etkindir. Bu ara yolunun devreden çıkması ile tümör gelişimi hızlanır ve geç dönem adenomlar gelişmeye başlar (36).

2.1.1.2. p53 Geni

p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda lokalize olup (17p) hücre çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir hücre fosfoproteini olan p53 proteininin sentezinden sorumludur. Hücre bölünmesinin baskılandığı, hücrenin hasara ve strese uğradığı durumlarda p53 geni hücreyi apoptoza uğratmakta görevlidir (35). P53 geninin inaktivasyonu adenomun karsinoma dönüşümüne aracılık etmektedir. Bu olay kolorektal karsinogenezin nisbeten geç dönemlerinde ortaya çıkan önemli bir basamaktır. Kolon kanserinde kromozom 17p nin delesyona uğrayan kısmı p53 geni içeren kısımdır ve sıklıkla p53 geninin bir alleli delesyona uğramışken diğer allelde nokta mutasyonu bulunmaktadır (37) .

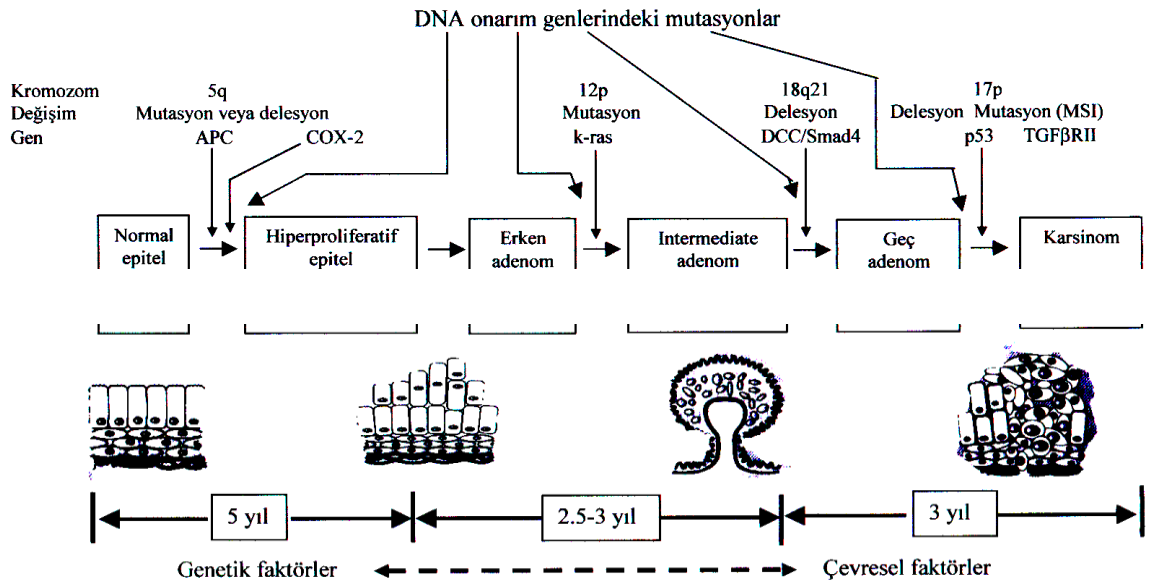
2.2.2. Protoonkogenlerin Aktivasyonu

2.2.2.1. Ras Onkogeni

Protoonkogenler hücrede uyarı iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynayan genlerdir. Bu genlerin uygunsuz aktivasyonları hücre yüzeyinden nükleusa gelecek mesajların anormal iletimine, anormal hücre proliferasyonuna ve sonuçta tümör oluşumuna yol açar (35). Ras geni bugüne kadar üzerinde en çok durulmuş olan onkogendir. 12 nolu kromozomun kısa kolunda (p) yer alır. Kirsten ve Harvey tarafından ilk defa farelerde tanımlanan ve intermediate aşamada kolorektal adenomdan karsinoma dönüşüm aşamasında kullanılmış bir onkogendir (37). Daha sonra KRAS (Kirsten RAS) ve NRAS (neuroblastom RAS) 1 cm 'den büyük poliplerde % 50 den fazla oranda tespit edilmiştir. Genellikle K-ras mutasyonları, nadir olarak N-ras mutasyonları adenomlarda gözlenir. KRAS geni GTP bağlayıcı proteini kodlar. Bu protein hücre membranındaki mitojenik sinyal değişimini sağlar. KRAS aktivasyonu ile GDT den GTP oluşur. Bu şekilde spesifik transkripsiyonel faktörler kaskadı başlar (38). Ras onkogenindeki mutasyonlar ile APC genindeki mutasyonlar ard arda gelince polip giderek büyür ve parmaklı uzantılara sahip bir hal alır. Bu aşama intermediate adenom aşamasıdır.

2.2.3. DNA Onarım Genlerindeki Değişiklikler (Mismatch Repair Gens)

Hücre bölünmesi sırasında spontan ya da çevresel etkilerle bir çok DNA hasarı oluşur. Replikasyon hataları DNA polimerazın 3'-5' eksonükleaz aktivitesi ile hemen düzeltilirken bu onarımdan kaçan hatalar ise DNA onarım (MMR: mismatch repair) sistemi yoluyla düzeltilir (35). DNA mismatch tamir genlerinin kaybı sonucu 'mikrosatellit' adı verilen tekrarlayan kısa DNA dizileri, DNA replikasyonu sırasında dengesizleşir ve bu durum tekrarlayan dizilerde devam ederek mikrosatellit dengesizliği oluşturur (7). Mikrosatellit dizilerinin çoğu genlerin kodlayıcı bölgeleri üzerinde bulduklarından bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sessizdir. Fakat bazıları hücre büyüme regülasyonu ile ilişkili genlerin kodlayıcı bölgelerinde yer alır. Tekrarlayan ünitelerde insersiyon veya kaybolmaya neden olur. TGF- β sinyalizasyonu kolon epitelium hücrelerinde büyümeyi engeller. MMR genlerinin kaybı bu genlerde ve diğer genlerde mutasyonlarının birikmesine ve KRK yol açar (37). MMR genleri hMLH1 (Human MutL homolog 1), hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2'dir. hMLH1 kromozom 3p, hMSH2 kromozom 2p'de üzerinde yer almaktadır. Klinik tanısı HNPCC (Hereditär nonpoliposis colorectal cancer) olan ailelerin %15-60'ında bu genlere ait mutasyonlar saptanmıştır. Diğer daha az rastlanan mutasyonlar ise hPMS1, hPMS2 ve hMSH6 genlerinde izlenmektedir (7). HNPCC hastalarındaki tümör dokularında karakteristik olarak mikrosatellit instabilite (MSI) izlenir. HNPCC'de kolorektal kanserli vakaların %90'nında ve adenomalı vakaların %80'inde MSI tesbit edilmiştir (37).



Şekil 2.2: Kolon Kanseri Gelişiminin Moleküler Temeli (39)

Adenom → karsinoma sekansının aşamaları şu şekilde şematize edilebilir:

Normal epitel → Kromozom 5q üzerinde APC ve MCC lokusunun kaybı veya mutasyonu → Hiperproliferatif epitel → DNA metilasyon kaybı → Erken evredeki adenom → Kromozom 12p üzerindeki ras geninin mutasyonu → Orta evredeki adenom → Kromozom 18q üzerindeki DCC geninin kaybı → Geç evredeki adenom → Kromozom 17p üzerindeki p53 geni kaybı → Karsinom

2.3. Kalıtsal Kolorektal Kanseri Sendromları

2.3.1. Familial Adenomatöz Polipozisler (FAP)

FAP, otozomal dominant kalıtılan bir hastalık olup kalın bağırsakta yerleşmiş yüzlerce adenomatöz polip oluşumu ile karakterizedir. Oluşan bu polipler normalde malign özellik taşımamasına rağmen zamanla invaziv kansere dönüşme olasılığı yüksektir. Hastalık 5 numaralı kromozomun uzun kolunda (5q21) lokalize olmuş bir tümör baskılayıcı gen olan Adenomatöz polipozis genindeki (APC geni) mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (32). Hastalarda, kolon dışında mide polipleri, osteoma, dental anomaliler, yumuşak doku tümörleri ve desmoid tümörler gözlenir (40).

Gardner Sendromu, Turcot Sendromu, Oldfield Sendromu ve Peutz Jeghers Sendromları FAP' ın varyantlarıdır.

2.3.2. Gardner Sendromu :

Gardner Sendromu, otozomal dominant kalıtım gösterir. Nadir görülen bir hastalık olup kolon polipleri ile birlikte, çok sayıda osteom ve cilt ve yumuşak dokuda mezenşimal tümör varlığı ile tanımlanmıştır (41). İlk defa 1952 yılında Elton Gardner ailevi polipozis koli hastalığı bulunan bir hastada bu sendromu tespit etmiştir. Polipozis koli malign transformasyon için çok yüksek risk taşır. Bu nedenle erken tanı ve tedavisi önemlidir (42).

2.3.3. Turcot Sendromu :

1959'da Turcot ve arkadaşları tarafından kolonda familyal adenomatöz polipozisle beraber, santral sinir sisteminin nöroepiteliyal tümörünün birlikteliğini bulmuşlar ve bu sendromu Turcot Sendromu olarak adlandırmışlardır (43).

Turcot sendromu otozomal dominant olarak geçiş gösterir. Bu sendromda; glial tümörler ve medulloblastomalar santral sinir sisteminde en sık görülen tümörleridir (43). Hastalar, genellikle hastalığın birinci veya ikinci evresinde tanı alırlar ve çoğunlukla multipl adenomatöz kolorektal poliplerden birkaç yıl sonra santral sinir sisteminde neoplazma bağlı bulgular gelişir (44). Bu kolorektal polipler adenomatöz tiptedir ve malignleşme insidansı % 100'dür. Kolorektal adenoma (non-polipozis) ve glioma birlikteliği olan (tip I) ve adenomatöz polipozis ve beyin tümörü birlikteliği olan (tip II) iki ayrı tipi tanımlanmıştır (45).

2.3.4. Familyal Hamartomatöz Polipozis

Bu grupta, Peutz-Jeghers sendromu (PJS), Juvenil polipozis, Cowden sendromu, Bannayan-Riley- Ruvalacaba sendromu, Cronkhite-Canada Sendromu bulunur (46).

2.3.5.Peutz-Jeghers Sendromu:

1921 yılında Peutz, 1949 yılında Jegher tarafından tanımlanmıştır. Otozomal dominant geçiş gösterir. Spesifik gen mutasyonu, 19p13.3 kromozomunda lokalizedir. Bu gendeki mutasyon (LKB1=serin-throzin kinaz proteini), hamartoma yapısına meyil oluşturur. Ağız, göz, bukkal mukoza, parmaklar, burun deliği, ayak parmağı, perianal bölge ve ayak tabanında mavi veya siyah pigment lekeler bulunur. Küçük intestinal hamartomatöz polipler vardır, ince barsak % 96, kolon % 27, mide % 24, rektum % 24 oranında hastalığa katılmıştır (47).

2.3.6.Cowden Sendromu (Multipl Hamartoma Sendromu):

Hereditör otozomal dominant bir sendromdur. 10q23 kromozomunda PTEN (protein-throzin phosphatase homologu kodlar) gen mutasyonu gözlenir. Deri ve mukus membranların diffüz hamartomaları ile karakterize bir hastalıktır. Santral sinir sistemi bulguları (makrosefali, mental retardasyon) % 10 oranında görülür. 1/3 vakada gastrointestinal hamartomalar vardır. Tiroid, meme malignitelerinin insidansı artmıştır (48).

2.3.7.Bannayan-Riley-Ruvalacaba Sendromu (BRRS):

Otozomal dominant bir hastalıktır. 10q23 kromozomunda PTEN gen mutasyonu vardır. Karakteristik dermatolojik bulguları vardır. Santral sinir sistemi anormallikleri (hipotoni, felç, mental gerilik, gecikmiş psikomotor gelişme) % 50 oranında bulunur (49).

2.3.8.Cronkhite-Canada Sendromu:

Mide, ince barsak ve kolon boyunca, jüvenil tipte jeneralize gastrointestinal polipozis ile karakterdir. Bu poliplerde adenomatöz değişiklikler ve kolon kanseri gelişebilir. Hastalarda, kutanöz hiperpigmentasyon, saçkıran (alopesi), diyare, kanama, kilo kaybı gözlenir (50).

2.3.9.Kalıtsal (Hereditör) Non-polipozis Kolorektal Kanser (HNPCC)

KRK'ler içinde en sık gözlenen kalıtsal (hereditör) non-polipozis kolorektal kanserdir (HNPCC) . Tüm kalın bağırsak kanser hastalarının % 5 nin oluşum şekli bu gruba girer (7). Ailesel adenomatöz polipozis sendromundan (FAP) farklı olarak bu hastalarda FAP'daki gibi yüzlerce polip oluşmaz. Hastalık; DNA tamir genlerindeki (MMR-mismatch repair) germline mutasyonlardan veya MSI instabilitesine (MSI) sahip tümörlerden kaynaklanır. Sonuçta, MMR genlerindeki mutasyon veya metilasyon değişikliğine bağlı ortaya çıkan inaktivasyon DNA tamir mekanizmasının bozulmasına neden olur. Bu da mutasyonların temizlenememesi ve MSI sonucunu doğurur. Temeldeki etken MMR gen mutasyonları iken kanser gelişiminin nedeni MSI'dir (37).

Hastalık tanısı, Amsterdam Klinik Kriterleri kullanılarak veya moleküler genetik testler ile MMR genlerinin bir veya birkaçında germline mutasyonların saptanması yoluyla konur.

Amsterdam kriterleri (51);

- 1) Üç veya daha fazla yakın akrabalarında kalın bağırsak kanseri olması
- 2) En az iki nesli etkileyen familial kolorektal kanser ortaya çıkması
- 3) En az bir vakanın 50 yaş altında tanı alması

Bu hastalık, genellikle sağ kolon kanseriyle karakterizedir ve erken yaşta ortaya çıkar. Lynch Sendromları olarak da bilinmektedirler.

Bu sendromlar;

Lynch1: Kolon ve rektumda kanserler oluşması ile bilinir. Genellikle ortalama 45’li yaşlarda başlayıp %70 oranında proksimal kolonu tutar.

Lynch2: Bu sendrom kolorektal kanserler yanında endometrium, overler, üriner sistem, ince barsaklar, mide kanserleri, beyin ve cilt kanserleri birlikte görülebilir (51).

2.4.MikroRNA

MikroRNA’lar ökaryotik hücrelerde bulunan, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan proteine traslasyonu yapılmayan ortalama 18-23 nükleotitten oluşan tek iplikli kısa RNA molekülleridir (52).

miRNA’lar gen ekspresyonun posttranskripsiyonel düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. İnsan hücrelerinde tanımlanmış yaklaşık 1000 miRNA’ nın % 60’ undan fazlası protein kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu RNA molekülleri kendi nükleotid dizilerinin tamamlayıcısı olan hedef mRNA’lara bağlanıp translasyonel baskılama veya mRNA yıkımı ile transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesini gerçekleştirirler. miRNA’lar bu yolağı kullanarak hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli roller oynamaktadır. İnsan kanserlerinde, miRNA sıklıkla genomik kırılma noktalarında bir onkogen yada tümör supressör gen gibi tümör gelişiminde rol alırlar. Çeşitli biyolojik süreçte rol alan miRNA’ ların ekspresyonları, kanser de dahil olmak üzere geniş bir hastalık grubunda gözlenmektedir (53).

miRNA’lar dokuya özgü olup insanlarda bütün hücre tipinde bulunurlar ve farklı hücrelerde farklı miRNA’lar eksprese edilirler ve kan dolaşımında saptanabilirler. Tek miRNA, farklı fonksiyonları olan yaklaşık 200 hedef gene bağlanmaktadır. miRNA’ların fonksiyonları arasında; gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesi, metabolik regülasyon, hafıza ve sinaptik gelişim organizmanın gelişimi için embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyümenin kontrolü gibi kritik rollere sahip olmaları, konakçı patojen etkileşimi, anjiogenez, tümörögenez, apoptozis ve onkogenlerle ilişkili olmaları yer almaktadır. Bu nedenle miRNA’lar birçok hastalık ile bağlantılıdır. Özellikle kolon, meme, over, prostat, beyin kanserlerinde anormal

eksprese edilirler (17). Ayrıca miRNA genlerin %50'den fazlası kanser ile ilişkili genomik bölgelere yerleşmiştir (10).

2.4.1.miRNA'ların Tarihsel Gelişimi

miRNA'lar, 1993 yılında Ambros laboratuvarında Lee ve ark. tarafından *C.elegans*'ta keşfedilmişlerdir. Lee ve ark. yuvarlak solucan olan *Caenorhabditid elegans*'ı gen içeriği bakımından taramışlar, Lin-4 ismini verdikleri genin hiçbir proteini kodlamayıp 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini raporlamışlardır (54). 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları *C.elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA keşfetmişlerdir. Let-7'nin insanları da içine alan türler arasında da korunmuş olduğu keşfedilmiş olup, bu durum let-7 nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (55). Tanımlanan bu RNA molekülleri geçici RNA'lar olarak tanımlanmıştır. Ancak mikroRNA terimi ilk olarak 2001'de kullanıma girmiştir ve aynı yıl miRNA oluşumunda rol alan DICER enzimi keşfedilmiştir. 2002 yılında ise miRNA- kanser ilişkisi belirlenmiştir. miR-15 ve 16'nın kronik lenfositik lösemide down-regüle olduğu ya da hiç sentezlenmediği belirlenmiştir. 2003 yılında matür miRNA'nın nükleusta başladığı gözlenmiş, ayrıca Pasquinelli ve ark. Let-7'nin tüm organizmalarda olduğunu keşfetmiştir. 2004 yılında virüslerinde miRNA kullandığı belirlenmiştir. Şu ana kadar (Aralık 2013) insan genomunda 1048 adet mikroRNA tanımlanmıştır (56).

2.4.2.MikroRNA Oluşum Basamakları

miRNA genlerinin büyük çoğunluğu (%61) protein kodlayan genlerin intronik bölgelerindedir, ancak eksonlarda veya genler arası bölgelerde de bulunabilir. miRNA'ların biyogenezi nükleusta başlar ve sonrasında sitoplazmada adım adım devam eder. Hedef genler üzerinde düzenleme etkisine sahip olan miRNA'ların işlevsel formu, olgun miRNA'lardır. mikroRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA(pri-miRNA)'ların

transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA(pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (57).

2.4.2.1.miRNA Transkripsiyonu ve pri-miRNA Oluşumu

MikroRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Bazı miRNA'lar RNA polimeraz III tarafından transkribe edilirler. Transkripsiyon sonrası oluşan ürün pri-miRNA (primer transkript) olarak adlandırılır. pri-miRNA (500-3000 baz), "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır (58).

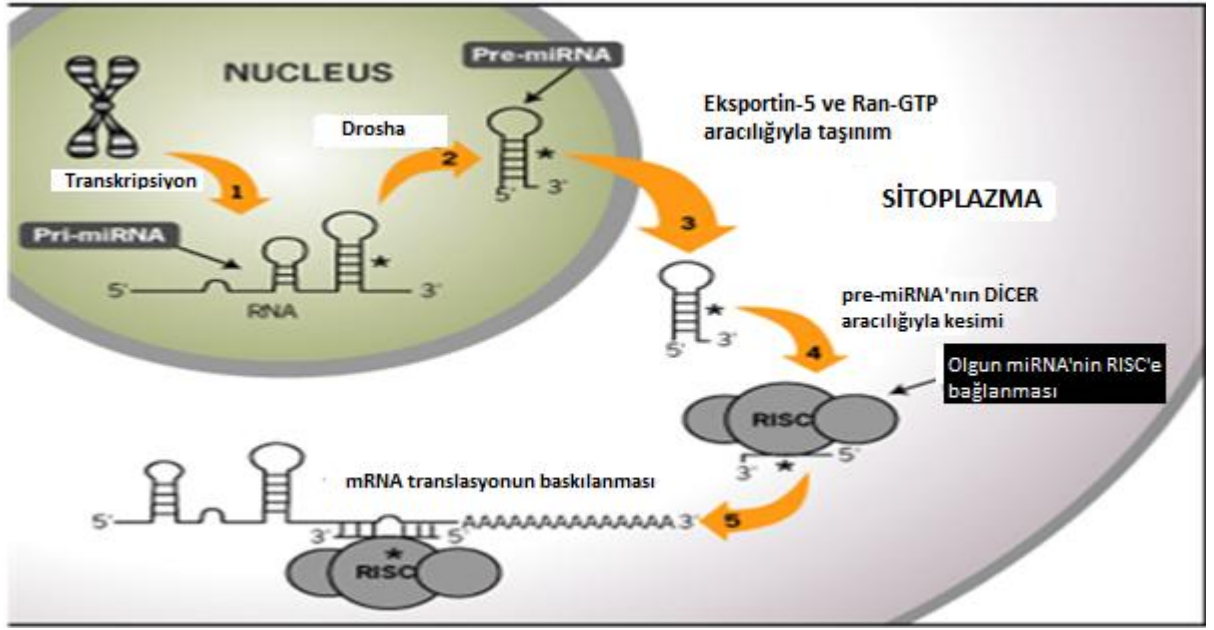
2.4.2.2.pri-miRNA'dan pre-miRNA Oluşumu

Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazi olan Drosha ve kofaktörü Pasha (veya DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region 8), tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür. Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein (dsRNA) olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) adı verilir (9). Çift iplikli RNA bağlayıcı proteinin mitokondriyal rRNA sentezinde ve miRNA biyogenezinde rol alan iki izoformu vardır. Mikro işlemci protein kompleksi, pri-miRNA molekülünü, uç ilmikten yaklaşık 22 nükleotid keser ve oluşan ürün pre-miRNA (prekürsör miRNA) adını alır.

Pre-miRNA yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundadır. Pre-miRNA molekülü bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (59).

2.4.2.3.miRNA Oluşumu

Sitozole aktarılan pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir. Dicer, 200 kDa protein ağırlığında Rnaz III ailesinden olan endoribonükleazdır. Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır (60). RISC, nükleaz aktiviteli bir RNA-multiprotein kompleksidir. 500 kDa ağırlığında olup yapısında endonükleaz, helikaz ve Argonaute (Ago) ailesinden protein bulunur. Dicer, pre-miRNA'nin sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA: miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan Ago'nun etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. MikroRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (61).



Şekil 2.3: miRNA Biyogenezi (62)

miRNA'ları kodlayan genlerin transkripsiyonu RNA polimeraz II (RNA Pol II) tarafından nükleusta gerçekleştirilir. Oluşan transkriptte pri-mRNA adı verilir. Pri-mRNA'nın Drosha ve DGCR8 tarafından kesilmesi ile öncül molekül pre-miRNA oluşur. Pre-miRNA, eksportin-5 ve Ran-GTP aracılığı ile nükleustan sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada pre-miRNA, TRBP ve Dicer tarafından kesilir ve sonuçta bir zinciri miRNA, diğer zinciri ise miRNA'ya eşlenik diziyi barındıran çift zincirli molekül oluşur. Bu çift zincirli molekül RISC'e yüklenir ve çift zincirli molekülün açılmasıyla miRNA'ya eşlenik olan dizi kompleksten ayrılarak degrade olur. Çift zincirin açılmasıyla aktif hale gelen RISC, miRNA ve hedef arasındaki eşleniklik seviyesine bağlı olarak ya doğrudan hedef DNA dizisinin yıkımını gerçekleştirir ya da hedef mRNA'nın translasyonunu baskılar.

2.5.miRNA ile Hedef mRNA Arasındaki Etkileşimi

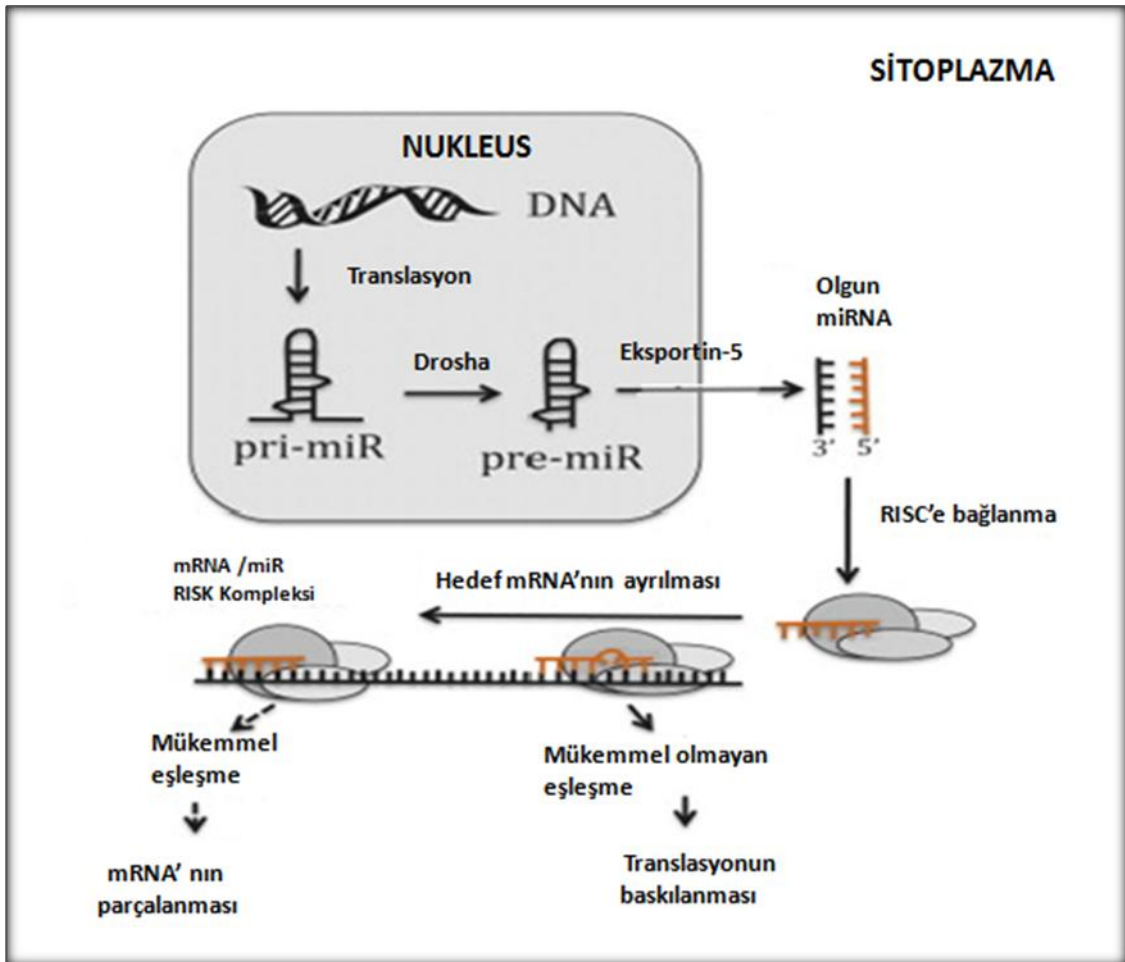
miRNA tarafından mRNA'nın tanınması miRNA'nın mRNA ile etkin eşleşmesine dayanır. Aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra miRNA'lar kendi tamamlayıcı mRNA molekülleri ile baz eşleşmesi yapar ve mRNA'nın bozulmasını tetikler veya mRNA'nın translasyonunu inhibe eder. Bu amaçla bir miRNA bir veya birden çok mRNA'ya komplementerdir (61).

RNA üzerinde 2-8 nt'lik merkez bölge bulunur ve bu bölge miRNA davranışı için kritiktir. miRNA hedef etkileşiminde miRNA'nın hedef transkriptin 3'-UTR bölgesindeki kusursuz olmayan bölgeye bağlanması gerekir. Hedef mRNA'nın 3'-UTR'ni hedef alan miRNA geninin 5' ucunda 7-8 nt uzunluğunda hedef mRNA'a

komplementer bölge içerir. miRNA-hedef eşleşmesinde Watson-Crick eşleşmesine ek olarak G:U baz eşleşmesinin de olması gerekir (9).

miRNA-mRNA komplementerliği tama yakın ise mRNA'nın parçalanması, komplementerlik daha az ise translasyonun baskılanması gerçekleşir. miRNA'lar translasyonu pre ve post translasyon basamaklarda inhibe etmektedirler.

Özgün olarak hedefle eşleşen miRNA'lar çeşitli aşamalarda gen ifadesini azaltır. Genellikle translasyonun durdurulması, mRNA deadenilasyonu ve degradasyonu veya daha az sıklıkla olmak üzere mRNA parçalanması ile başarılıdır (63).



Şekil 2.4 : miRNA-mRNA komplementerliği (64)

2.6.miRNA'ların Kansere İlişkisi

miRNA'lar ve kanser arasındaki ilk bağlantı bazı miRNA'ların hücre büyümesini ve apoptozu düzenlediğinin belirlenmesi ve bu miRNA'ların bazılarının kanserle ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde bulunduğu anlaşılması ile ortaya çıkmıştır (65).

miRNA ekspresyonu sayesinde hücre gelişimi ve farklılaşması sıkıca düzenlenir. Kansere hücrelerinde anormal miRNA ekspresyonu kısmen maligne transformasyonla birlikte normal hücrenin farklılaşmasının bir sonucu olabilir.

miRNA'lar, hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör süpresör özellik kazanabilir. Kansere gelişiminde mikroRNA'lar, onkogen ve tümör süpresör mRNA'ların her ikisini de potansiyel hedef olarak görebilir. Bu yüzden, belirli bir miRNA'nın gerçek fonksiyonu ya TS-mir (Tümör süpresör miRNA)'in veya onko-mir (Onkogen miRNA)'in hücre içi içeriğine bağlıdır.

2.6.1.Tümör Süpresör miRNA'lar

Tümör süpresör miRNA'ların (TS-mir) görevleri onkogenlerin ekspresyonunu kontrol etmektir. Tümör baskılayıcı miRNA'lar tümör oluşumunu onkogenleri baskılayarak ve farklılaşmayı sağlayan genlerin aktivitesini artırarak engel olurlar. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olur.

İlk keşfedilen miRNA olan let-7, aynı zamanda tümör baskılayıcı işlevi gösterdiği belirlenen ilk miRNA'lardandır. let-7'nin kanserlerde genellikle delesyona uğrayan bir kromozomal bölgede bulunması ve gen ifadesinin azalmasının onkogenik farklılaşma kaybına yol açtığı belirlenmesi let-7'nin tümör baskılayıcı etki gösteren bir miRNA olarak kabul edilmesine sebep olmuştur (66).

2005 yılında Johnson ve arkadaşlarını (67) yaptıkları çalışmada let-7 ailesinin üyelerinin, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyen tümör süpresör fonksiyona sahip olduğunu bulmuşlardır. Yaptıkları çalışmada düşük seviyede let-7 bulunduran akciğer

tümör dokularında RAS protein seviyelerinin önemli derecede artmış olduğunu ve RAS onkogeninin mRNA dizisinin, let-7'ye komplementer bağlanma bölgeleri içerdiğini gözlemlemişlerdir. Böylece RAS proteininin translasyonunun let7 tarafından engellenerek bastırıldığının belirlemişlerdir.

Cimmino ve arkadaşlarının (68) 2005 yılında yayınladıkları çalışmada miR-15a ve miR16-1'in kronik lenfotik lösemide anti-apoptotik gen bcl-2'yi hedef alarak tümör süpresör aktiviteye sahip olduklarını ortaya koymuşlardır. Tümör süpresör karakter sergileyen bir başka mikroRNA ise miR-29'dur. Mir-29 ailesinin üyelerinin kronik lenfositik lösemi (KLL), akciğer kanseri, invaziv meme kanseri, akut miyeloid lösemi (AML) ve kolanjiyokarsinom hücrelerini baskılayıcı olarak aktivite gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (69).

2.6.2.Onkogen miRNA'lar

Bazı miRNA'ların tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını ve apoptozu kontrol eden genleri engelleyerek kanser gelişimini arttırdığı görülmektedir. Böyle miRNA'lar onkogen miRNA'lar (onko-mir) olarak adlandırılırlar. Bu miRNA'lar bir tümör süpresörün baskılanmasını sağlarlar.

miR-155 ilk olarak keşfedilen onkogenik miRNA'lardan biri olup, protein kodlamayan gen olan BIC (B cell İntegration Cluster) ile beraber eksprese edilmektedir (70). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miR-155'in B hücreli lenfoma, meme, pankreas, akciğer gibi kanserlerde yüksek ekspresyon sergilediği gösterilmiştir (71). Mir-21'de onkogen olarak işlev gören mikroRNA'lardan biri olup AML, KLL ve glioblastoma gibi hematolojik malignitelerde ve pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme ve karaciğer kanseri gibi birçok kanser türünde yüksek seviyede ekspresyonu gözlenmiştir (72).

miRNA transkripsiyonunun kritik düzenleyicilerinden biri proto-onkogen olan c-Myc genidir. Bu gen, insan genlerinin %10-15'ini düzenleyerek hücre büyümesini ve apoptozu kontrol eder (73). c-Myc geni ifadesi üzerindeki kontrolün kalkması protein kodlayan genlerin hem aktivasyonu hem de baskılanması ile ilişkilidir ve bu durum birçok kanser türünde gözlenir. c-Myc geni aynı zaman da miRNA genlerinin transkripsiyonunu da düzenler (74). c-Myc, miRNA promotorlarında bulunan E-

kutularına bağlanır ve miR-17-92 gen kümesinin transkripsiyonunu tetikler. miR-17-92 insan genomunda kromozomun 13q31.3 lokalizasyonunda yerleşiktir ve altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlamaktadır. Bunların hücre döngüsünü düzenleyen E2F1'i baskıladığı bilinmektedir. Tümörlerde görülen artmış c-Myc aktivasyonu ile tutarlı olarak, miR17-92 genellikle tümörler de yüksek oranda ifade edilir (75). c-Myc, miR17-92 kümesinden miRNA'ların ifadesini artırmasının yanı sıra tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-15a-19-34 gibi bir çok miRNA'nın ifadesini de azaltır (76).

2.7.Kolorektal Kanserde MikroRNA'nın Rolü:

miRNA'lar kolorektal kanser patogeneğinde rol alan birçok onkogenik ve tümör süpresör yolun düzenlenmesinde işlev görürler. KKK gelişiminde etkili olan sinyal yollarındaki proteinler (Wnt/ beta katenin, fosfotidilinositol-3 kinaz yolağı, KRAS, p53 gibi) miRNA regülasyonundan etkilenmektedir (77). Wnt/beta katenin yolağı erken kolorektal tümör gelişiminde önemli role sahiptir. Kolorektal karsinogenezin başlamasında en önemli olay olan APC genin mutasyona uğraması, kolorektal adenoma ve karsinomların %60'ında saptanmakta ve bu da Wnt/beta katenin yolunun aktivitesine yol açmaktadır (78).

Yapılan çalışmalarda KKK'de miRNA ekspresyonunun diagnostik bir marker olarak kullanılabilceğı gösterilmiştir. İlk olarak Michael ve ark. 2003 yılında yaptığı çalışmada miR-143 ve miR-145 düzeyinin adenomlu ve kolorektal kanserli hastalarda ekspresyonunun azaldığını tespit etmişlerdir (79).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda Chen ve ark. (80) kolorektal kanserli hastalarda miR-143 ve KRAS ekspresyonu arasında zıt bir ilişki saptamışlardır. Bir başka çalışmada kolorektal kanserli hastalarda plazmada miR-92 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuş ve kolorektal kanser tanısında non-invaziv biomarker olarak kullanılabilceğini belirtilmiştir (7). Server ve ark.'nın (81) yaptıkları çalışmada miR-145 'in normalde kolon epitelinden eksprese olduğu, kolon kanserinde ise proksimal kolon tümörlerinde ve 50 mm büyük boyutta olan tümörlerde ekspresyon düzeyinin

azaldığı gözlenmiştir. Svoboda ve ark. (82) yaptığı çalışmada ise rektum kanserli hastalarda miR-125b ve miR-137 yüksek düzeyde ekspresyonun tedaviye yanıtı ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

miR-196a ile yapılan çalışmada ise miR-196a'nın embriyogenez, organogenez ve onkogeneze önemli rol oynayan homeobox (Hox) gen kümesi içerisinde yer alan 3 varyant geninin olduğu bulunmuştur. Bunlardan miR-196a-1 geninin 17. kromozomda lokalize olan HOX B9 ve HOX B10 genleri arasında bulunduğu, miR-196a-2 geninin kromozom 12 üzerinde lokalize ve HOX C10 ile C9 bölgeleri arasında bulunduğu, miR-196b geninin ise 7. kromozomda lokalize ve HOX A9 ile HOX A10 genleri arasında bulunduğu keşfedilmiştir (83). Ayrıca miR-196'nın pankreas adenokarsinom tanısında, prognostik belirteç olarak ve tedavi yanıtının değerlendirilmesinde faydalı olabileceği belirtilmiş ve miR-196 düzeyinin meme ve özefagus kanserinde de yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca lösemili hastalarda da ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise miR-196'nın kolon kanserinde pro-onkogenik etkisinin olduğu saptanmıştır (84).

2.8.miRNA Oluşum Yolağı ile İlişkili Polimorfizmler

Polimorfizm, toplumda %1'den daha yüksek sıklıkta bulunan genetik çeşitlilik tipi ya da gen seçenekleri olarak tanımlanır. İnsan genomunda en çok bulunan genetik çeşitlilik tipi, DNA daki tek nükleotit değişiklikleri olarak adlandırılan SNP'lerdir (Single Nucleotide Polymorphism) (85). Genomdaki SNP'lerin pek çoğu translasyonu yapılmayan intronik veya eksonik bölgelerde bulunur. SNP'lerin çeşitliliği insan genomunda oldukça yüksek olup genom boyunca hemen hemen her 100 baz çiftinde bir meydana gelir. Bu SNP'ler buldukları yere göre gen ekspresyonunu etkileyebilir ve çeşitli hastalıklardan sorumlu olabilirler (86).

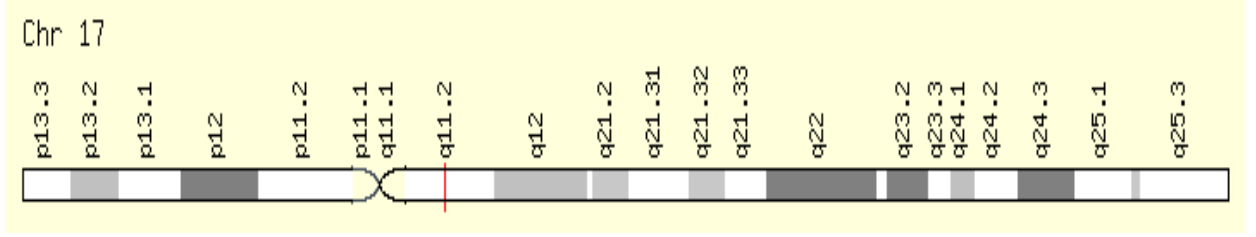
Gen ekspresyonunu etkileyen SNP'ler, miRNA'ların hedef mRNA ile etkileşiminde temel göreve sahiptirler. miRNA'ların bağlanma bölgelerinde olabilecek bir SNP, miRNA'nın hedeflediği genin ekspresyonunu etkiler. Bu etkinin derecesi miRNA-hedef ilişkisinin derecesine bağlıdır. miRNA'nın hedefle eşleşmesinde 5' ucundaki 2-8 nt'lik merkez dizi esas olduğu için hem miRNA'nın kendi dizisinde hem

de hedefindeki dizide olabilecek SNP'ler, miRNA-hedef mRNA arasındaki eşleşmenin gerçekleşmemesine ve hedefteki genin regülasyonunun yapılamamasına neden olur. Özellikle miRNA olgunlaşma yolağından sorumlu genlerdeki SNP'ler de ciddi sorunlar ortaya çıkarabilir. Bu sorunlar miRNA'nın ilk sentezlendiğı aşamadan itibaren görülebilir. Örn: pri-miRNA'dan pre-miRNA oluşumunda görevli DROSHA-DGCR8 kompleksinin bağlandığı dizilerde veya bu genlerin kendisinde oluşabilecek SNP'ler pri-pre miRNA dönüşümünün yapılamamasına neden olabilir (85).

Sonraki adımda pre-miRNA'ların sitoplazmaya taşınımını sağlayan Exportin-5'de olabilecek SNP'ler ise miRNA'ları sitoplazmaya taşıma görevini yerine getirmesine engel olabilir. Bu durumda miRNA'ların hücre içerisinde birikmesi beklenir fakat hücrede birikemeyecek kadar kısa ömürlü olmalarından dolayı parçalanarak kaybolurlar. miRNA olgunlaşma mekanizmasındaki diğer genlerden DICER, RAN-GTP, AGO1, AGO2, GEMIN3, GEMIN4, TARBP2, XPO5 genlerinde veya hedef aldıkları miRNA üzerinde olabilecek SNP'ler de miRNA olgunlaşma mekanizmasının çalışma düzenini bozabilir. Yapılan çalışmalarda miRNA'ların kendi dizilerindeki SNP'lerin sıklığının oldukça az olduğu bulunmuştur. Bu nedenle hedef aldıkları genlerdeki SNP'lerin önemi artmaktadır (86).

2.9. pre-miR-423 rs6505162 (A/C)

miR-423, insan genomunda kromozom 17q11.2'da lokalizedir. mRNA'ların alternatif kesimlerini içeren NSRP1(Nuclear Speckle Splicing Regulatory Protein) geninin ilk intronunda yer alır (56). miR-423'nin ilk olarak 2004 yılında tedavi edilemeyen HL-60 lösemi hücrelerinde 2-O-tetradekanoylporbol-13-asetat kaynaklı farklılaşma deneyleri sırasında olgun miRNA'ların farklılaşma süreçlerini etkilediğı belirlenmiştir (87).



Şekil 2.5: pre-miR-423 (rs6505162) Geninin Kromozomal Lokalizasyonu (56)

miR423 2008 yılında olgun miRNA olarak nöroblastoma dokularında ve hücre hattında RNA klonlama ve Northern blot yöntemleriyle tespit edilmiş olup, miR423'ten gelişen olgun miRNA'ların değişen ekspresyonu baş ve boyun kanseri, meme kanseri ve kolorektal kanser gibi birçok multipl kanser tipleri ile rapor edilmiştir (14-15).

Farazi ve ark. (88) yaptıkları çalışmada meme kanserinde miR423'ün düşük eksprese olduğunu ve miR-423'ün bütün olgun formlarının kadınlarda metastaz gelişen duktal karsinomlarda yüksek eksprese edildiğini saptamışlardır. Bu çalışmadan esinlenerek Smith ve ark. (89) yaptıkları çalışmada meme kanseri gelişiminde pre-miR-423 gen polimorfizminin düşük risk taşıdığını rapor etmişlerdir. Yapılan başka çalışmalarda rs6505162'nin yumurtalık kanseri riskini önemli derecede arttırdığı, özefagus kanseri, renal hücre karsinomu ve prostat kanserinde ise düşük risk gözlemlenmiştir (90).

Xing ve ark.'larının Çin popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada, kolorektal kanser tanısı konmuş 408 hastada farklı pre-miRNA SNP bölgesini tarayarak pre-miR-423 ve pre-miR-608 olmak üzere 2 farklı pre-miRNA bölgesinin kolorektal kanser gelişiminde etkili olduğunu gözlemlemişlerdir (17).

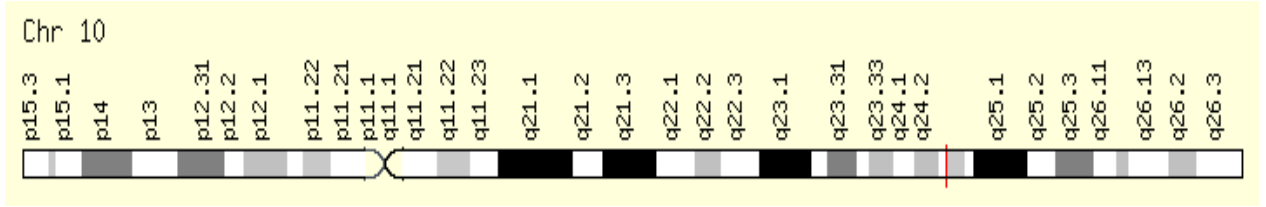
2.10. pre-miR-608 rs4919510 (C/G)

Tümör supressör miRNA olduğu düşünülen miR608, kromozom 10q24'de lokalize olup fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. 25bp olan sekansın 22 bp'ı olgun miRNA'yı oluşturur (14). miR608 rs4919510 olmak üzere tek SNP bölgesi içerir. C/G polimorfizmi birçok popülasyonda yaygındır. miR-608' in prelokusundaki heterozigot kaybının kolorektal, prostat, pankreatik ve beyin gibi birçok insan kanserlerine sebep olduğu belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda miR-608 gen bölgesindeki rs4919510 SNP

hedef bölgelerinin BCL-XL, SEPT9 ve CDK olduğu düşünülmektedir, miR-608'in bu hedef bölgelerinin değişmesi KRK hücre gelişmesiyle doğrudan ilişkilendirilebilir (16).

Xing ve ark.'larının yayınladığı makalede Çin popülasyonunda kolorektal kanser tanısı konmuş 408 hastada rs4919510 (C/G) SNP bölgesinin kolorektal kanser ile ilişkisinin olduğunu tespit etmişlerdir. C allel varyantının hücrenin genel sağkalımı ve hastalığın tekrar nüksleme riskini azaltırken, G alelinin ise hastalıkla ilişkili olmadığını ortaya koymuşlardır (17).

Brid ve ark Afroamerikalılar ile yaptıkları çalışmada kolorektal tanısı konmuş 245 hastada rs4919510 SNP bölgesinin kolorektal kanser gelişiminde risk faktörü olmadığını sonucunu ortaya koymuşlardır (18).



Şekil 2.6: pre-miR-608 (rs4919510) Geninin Kromozomal Lokalizasyonu (56)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

“Kolonorektal Kanserli Hastalarda pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) Gen Polimorfizmlerinin” araştırıldığı bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarının oluşturulması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Moleküler biyolojik analizler ise GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi’nde yapılmıştır.

Çalışmada; hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden DNA izolasyonu için, 6-7 ml’lik venöz kan 1 ml % 2 ‘lik etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) içeren, 15 ml’lik santrifüj tüplerine konulmuştur. DNA izolasyonuna kadar +4°C de saklanmış olup DNA eldesi High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche marka DNA izolasyon kiti) ile yapılmıştır. Ayrılan kanlardan plazma eldesi yapıp çalışma zamanına kadar -80’de saklanmıştır. Elde edilen DNA’lardan pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) polimorfizmlerine ait gen bölgelerinin çoğaltılması, genotiplendirilmesi ve analizleri “Bioneer Marka ExiCycler96 Model Real Time PCR” cihazı ve ExiData V3.54.8 yazılımı (Bioneer) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- ExiCycler Model Real Time PCR Cihazı (Bioneer Kat No: A-2060, Exi-05C-1201027)
- (Dynex Technologies, Virginia, USA)
- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Vorteks (VELP)

- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031D)
- Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)
- Otomatik Pipet Seti (Arise, Kat No: A-Pette)
- Filtreli Pipet ucu (AXYGEN, Kat No: AXT-300)
- Eppendorf tüpler (AXYGEN, Kat No: AXMCT-150-C)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) (Sigma E-5134)
- DNA İzolasyon Kiti (Roche)
- Steril distile Su (Sigma W-3500)
- qPCR Master Mix (Bioneer, içerdikleri: Taq DNA Polimeraz, 10X reaction buffer, Dye (Xylene Cyanole), Stabilizer (sorbitol), Tween 20, dNTP)
- AccuPower GreenStar qPCR PreMix (Kat No: K-6210, Bioneer)
- Primer/Probe (Bioneer Kat No: S-1001)

A/C pre-miR-423 rs6505162 Gen Polimorfizmi için

F: 5'- ACGTTGGATGTTTTCCAAAAGCTCGGTCTG -3'

R: 5'- ACGTTGGATGCAAGCGGGGAGAACTCAAG -3'

C/G pre-miR-608 rs4919510 Gen Polimorfizmi için

F: 5'- ACGTTGGATGAAGATCCACTGGGCCAAGGT -3'

R: 5'- ACGTTGGATGATGGAAGCTCTTGGAGATGC -3'

3.1.3. DNA İzolasyonu

DNA ile ilgili yapılan moleküler analizlerin ilk basamağını DNA izolasyon yöntemi oluşturur. İnsan genomik DNA'sının ekstraksiyon, izolasyon ve pürifikasyonuna ilişkin çok çeşitli protokoller geliştirilmiştir. pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) Genlerine ait SNP bölgelerini tespit etmek amacıyla gerekli olan DNA örnekleri kit ile izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

DNA izolasyon yöntemlerinde birbirini izleyen üç temel aşama bulunmaktadır.

1. Hücrenin parçalanması ile yüksek molekül ağırlıklı DNA'nın açığa çıkması.
2. Denatürasyon veya proteoliz ile DNA-protein kompleksinin ayrılması ve DNA'nın çözünür duruma getirilmesi.
3. DNA'nın basit enzimatik ve/veya kimyasal yöntemlerle proteinler, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması.

Hücre Duvarının Parçalanması

Hücrenin çekirdeğindeki DNA'ya ulaşmak için hücre duvarının parçalanması gerekmektedir. Parçalama fiziksel ve kimyasal yollarla yapılabilir. Fiziksel olarak ısıtılan hücreler aynı zamanda kimyasal karışımlara tabi tutularak duvarın parçalanması sağlanır. Bu kimyasal karışım içinde bulunan tuz, hücre duvarından geçerek proteinleri DNA'dan ayırır. Deterjan ise hücre duvarının geçirgenliğini arttırarak hücre içeriğinin serbest kalmasını sağlar. EDTA magnezyumu bağlayarak DNaz aktivitesini inhibe eder böylece DNA stabil halde kalabilir. Protein parçalayıcı enzimler ise hücre içeriğindeki proteinleri parçalayarak, sonraki aşamalar açısından homojen bir karışım oluşmasını sağlamaktadırlar. Hücre içinde bulunan RNA'lar tek iplikçik halde stabil olabildiklerinden onların da ortamdan uzaklaştırılması gerekir ve bunun için de RNaz enzimi kullanılır.

DNA'nın Denatürasyonu

Denatürasyon, DNA-Protein kompleksinin çözülmesi ve diğer moleküllerden ayrılmasıdır. Denatürasyon işleminde genellikle fenol ekstraksiyonu işlemi kullanılır. Fenol ile proteinler ve DNA fragmanları birbirinden ayrılır ve uzaklaşmaları sağlanır. Spin kolonlarının kullandığı fiziksel çözülmeye ise, özel solüsyonlar ile DNA'nın tüpler içine özel olarak yerleştirilen matriks tabakasına tutunması sağlanır. Aynı aşamada DNA haricindeki moleküller matrikse tutunamadığı için ortamdan uzaklaşır. Spin kolonlar belirli solüsyonlar ile yine DNA harici maddelerin tamamen uzaklaşması için "yıkama" denilen işleme tabi tutulurlar. Son aşamada ise DNA ile matriksi birbirinden elimine eden solüsyonların kullanıldığı "Elüsyon" aşaması vardır ve bu aşama ile birlikte DNA son halini almaktadır.

3.1.4. DNA İzolasyonunda İzlenen Yol

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubuna ait bireylerden alınan 6-7 ml periferik kan, üzerinde her birey için özel protokol numarası kaydedilen ve içerisinde 1 ml EDTA bulunan 15 ml'lik plastik tüplerde -20 °C'de saklanmıştır. 1,5ml'lik steril santrifüj tüplerine her bireye ait özel protokol numaraları kaydedilerek içlerine 200µl periferik kan örneği pipetlenmiş ve DNA izolasyonu için aşağıda sıralanan yöntem uygulanmıştır:

- Steril santrifüj tüpü içerisine pipetlenen 200µl periferik kan üzerine 400µl Lysis Solüsyonu ve 20µl Proteinaz K Solüsyonu eklendi, dikkatlice vortekslenerek karışması sağlanmış,
- Örnekler su banyosunda 56 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmış,
- İnkübasyonu tamamlanan örneklerin üzerine 200µl % 96'lık etanol eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılmış,
- Hazırlanan karışım 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek kolona aktarılmış ve 6000rpm'de 1dk santrifüj edilmiş, toplama tüpü atılarak kolon yeni toplama tüpüne yerleştirilmiştir,

- Kolon üzerine 500µl Wash Buffer I pipetlenmiş ve 8000rpm’de 1dk santrifüj edilmiş, toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak kolon tekrar yerleştirilmiştir,
- Kolon üzerine 500µl Wash Buffer II pipetlenmiş ve maksimum hızda (>12000rpm) 3dk santrifüj edilmiştir, toplama tüpü atılarak kolon 1,5ml’lik steril saklama tüpüne yerleştirilmiş,
- Kolon üzerine 200µl Elution Buffer pipetlenmiş 2dk oda ısısında bekletildikten sonra 8000rpm’de 1dk santrifüj edilmiştir
- Kolon atılmış ve elde edilen DNA +4 °C’de saklanmıştır.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışma grubu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı’nda kolorektal kanser tanısı almış, 18-65 yaş aralığındaki 100 Hasta , kontrol grubu ise herhangi bir hastalığı olmayan 100 sağlıklı bireyden oluşturulmuştur. Kontrol grubu, hasta grubuyla sayı, ve cinsiyet dağılımı açısından uyumlu olacak şekilde seçilmesiyle oluşturulmuştur. Çalışma için Mersin Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır. Hem hasta hem de kontrol grubundaki bireylerden çalışmaya dahil olmayı kabul ettiklerine dair etik kurulda belirtilen yönergelerle uygun bir biçimde hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formunu doldurmaları istenmiştir. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin onayı alındıktan sonra, 6-7 ml periferik kan alınarak 1 ml, % 2’lik EDTA içeren santrifüj tüplerine konulmuştur.

3.3. Pre-miR-423 Geninde rs6505162 Gen Polimorfizmi (A/C) ile pre-miR608 Geninde rs4919510 (C/G) Gen Polimorfizminin Belirlenmesi

3.3.1. Pre-miR-423 geninin rs6505162 SNP bölgesi ile pre-miR608 geninin rs4919510 SNP bölgesinin özgül primerlerle amplifikasyonu

pre-miR-423 genine ait rs6505162 polimorfizmi ve pre-miR608 genine ait rs4919510 polimorfizmi “Bioneer” tarafından üretilen, Q-PCR Premix sistemine göre

“Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu” (Real Time Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle belirlenmiştir.

Çizelge 3.1: pre-miR-423 ve pre-miR-608 genlerine ait primerler

Primerler	Sekansları	Uzunluk
pre-miR-423 (A/C)		
Forward Primer:	5'-ACGTTGGATGTTTTCCAAAAGCTCGGTCTG -3'	30
Reverse Primer:	5'-ACGTTGGATGCAAGCGGGGAGAAACTCAAG -3'	30
Pre-miR-608 (C/G)		
Forward Primer:	5'- ACGTTGGATGAAGATCCACTGGGCCAAGGT -3'	30
Reverse Primer:	5'- ACGTTGGATGATGGAAGCTCTTGGAGATGC -3'	30

3.3.2. SNP Özellikleri

Çizelge.3.2 pre-miR-423 genine ait rs6505162

GEN-SNP rs	rs6505162 [<i>Homo sapiens</i>]
Varyant (M>m)	A/C
Çoğaltılan Sekans	CTGAGGCCCTCAGTCTTGCTTCCTA[A/C]CCCGCGCTTGAAGTTTCTCCCCGCTT FAM/TAMRA

Çizelge.3.3 pre-miR-608 genine ait rs4919510

GEN-SNP rs	rs4919510 [<i>Homo sapiens</i>]
Varyant (M>m)	C/G
Çoğaltılan Sekans	GGGCCAGGGGTGGTGTGGGACAGCT[C/G]CGTTTAAAAAGGCATCTCCAAGAGC FAM/TAMRA

3.3.2.1. Real Time-PCR reaksiyon ortamının hazırlanması

Polimorfizmlerin belirlenmesi için önce Real Time PCR reaksiyon miksi 96 kuyucuklu saydam polipropilen tabağın (plate) kuyucuklarına dağıtılmıştır. Hazırlanan karışımın kontamine olup olmadığını belirlemek için her bir reaksiyon tabağında örnek DNA içermeyen negatif kontrol kuyucuğu kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu plate için Real Time PCR Film ile kuyucukların üzeri kaplanmıştır. Isı bloğuna yerleştirilen plate daha önceden hazırlanan yürütme metodu şablon dosyası açılarak reaksiyon başlatılmıştır. Yaklaşık iki buçuk saat süren deneyin ardından genotip tayini yapılmaya çalışılmıştır. Her bir polimorfizm için şablon dosyada kayıtlı aşağıdaki Real Time PCR şartları kullanılmıştır:

- 43,0 µl, PCR Grade Water
- 5,0 µl Örnek DNA'sı (Yaklaşık 50 ng/uL)
- 1,0 µl, Primer/Prob Seti (10 pmol/uL)
- µl, qPCR PreMix (İçeriği: Taq DNA Polimeraz, 10X reaction buffer, Dye (Xylene Cyanole), Stabilizer (sorbitol), Tween 20, dNTP)

Çizelge 3.4: Real Time PCR şartları, kullanılan malzemeler ve miktarları

Q-PCR Reaksiyon Karışımı		Reaksiyon Hacmi
Örnek	Negatif Kontrol	5ml
	Örnek DNA	5ml
Forward Primer		1ml
Revers Primer		1ml
PCR Grade Su		43ml
Toplam		50ml
Basamak	Sıcaklık	Çalışma Zamanı
Line1: ilk-denatürasyon	95	5 dakika
Line2: denatürasyon	95	5 saniye
Line3: ayrılma ve uzama	60	40 saniye
Scan	Hedef boya/filtre: FAM/TAMRA	

3.4. İstatistiksel Analiz

Kolorektal kanserli hastalar ile kontrol grupları; *pre-miR423* ve *pre-miR-608* gen polimorfizmlerinin KRK ile arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan istatistiksel testler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapılmıştır. Hasta ve kontrol grubunun örneklem sayısının belirlenmesi için “*Power analizi*” kullanılmıştır. Gruplar arasında yaş bakımından bir farklılık olup olmadığının incelenmesi amacıyla “*Independent Samples t test*” kullanılmıştır. Hastalık ile genotiplerin ve allellerin ilişkileri “*ki-kare*” veya “*Likelihood ratio*” testleri ile incelenmiştir. Genotipler bakımından hasta ve kontrol gruplarının “*Hardy-Weinberg*” dengeleri kontrol edilmiştir. Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma, kategorik değişkenler için ise frekans ve yüzde olarak verilmiştir. İstatistik analizler SPSS v.11.5 paket programı ile yapılmış, istatistik analizlerde $p < 0,05$ ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KRK Görülme Oranlarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı

Yapılan çalışmada KRK tanısı konulmuş olan hasta grubunu oluşturan bireylerin 65'i erkek (% 65) ve 35'i kadın olup (% 35) yaş ortalamaları $56,89 \pm 12,91$ olarak belirlenmiştir (çizelge 4.1). Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan 100 bireyin 58'i erkek (% 58), 42 si kadın (% 42), yaş ortalamaları ise $52,600 \pm 13,73$ 'tür. Yaş değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,024$). Hasta grubunun yaş ortalaması kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Cinsiyet ile grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı gözlenmiştir. ($p=0,309$)

Çizelge 4.1 KRK hasta ve kontrol grubu yaş ve cinsiyet dağılımı

	Kontrol	Hasta	p
	ort±st.sapma	ort±st.sapma	
Yaş	52,600±13,73	56,89±12,91	0,024

		Kontrol	Hasta	p
		n(%)	n(%)	
Cinsiyet	Erkek	58 (%58,0)	65 (%65,0)	0,309
	Kadın	42 (%42,0)	35 (%35,0)	

4.2 *pre-miR-423* (A/C) rs6505162 Gen Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı ve KRK ile İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde, hasta ve kontrol grubunun *pre-miR-423* gen polimorfizmi açısından ‘Hardy Weinberg’ dengesinde olmadığı saptanmıştır. ($p < 0,001$).

Çizelge 4.2 Hardy Weinberg Denge Kontrolü (*pre-miR-423*)

	Genotipler	Gözlenen değer	Beklenen değer	P değeri
Kontrol	AA	48 (%48)	34,22	<0,001
	CA	21 (%21)	48,56	
	CC	31 (%31)	17,22	
Hasta	AA	36 (%36)	20,70	<0,001
	CA	19 (%19)	49,60	
	CC	45 (%45)	29,70	

Hasta ve kontrol grubunda genotip olarak interaksiyon olduğu için Chi-square test for trend'den hesaplamalar yapılmıştır.

pre-miR-423 A/C (rs6505162) polimorfizmine ait genotip sıklıkları KRK'li hasta ve kontrol grubundaki bireylerde incelendiğinde;

AA genotipinin görülme sıklığı; KRK'lı hastalarda % 36, kontrol grubunda % 48 olarak;

CA genotipinin görülme sıklığı; KRK'lı hastalarda % 19, kontrol grubunda % 21 olarak;

CC genotipinin görülme sıklığı; KRK'lı hastalarda % 45, kontrol grubunda ise % 31 olarak bulunmuştur.

Sonuçlar allel sıklığı bakımından oransal olarak incelendiğinde;

Kontrol grubunda

A aleli %58.5, C aleli %41.5 olarak bulunmuştur.

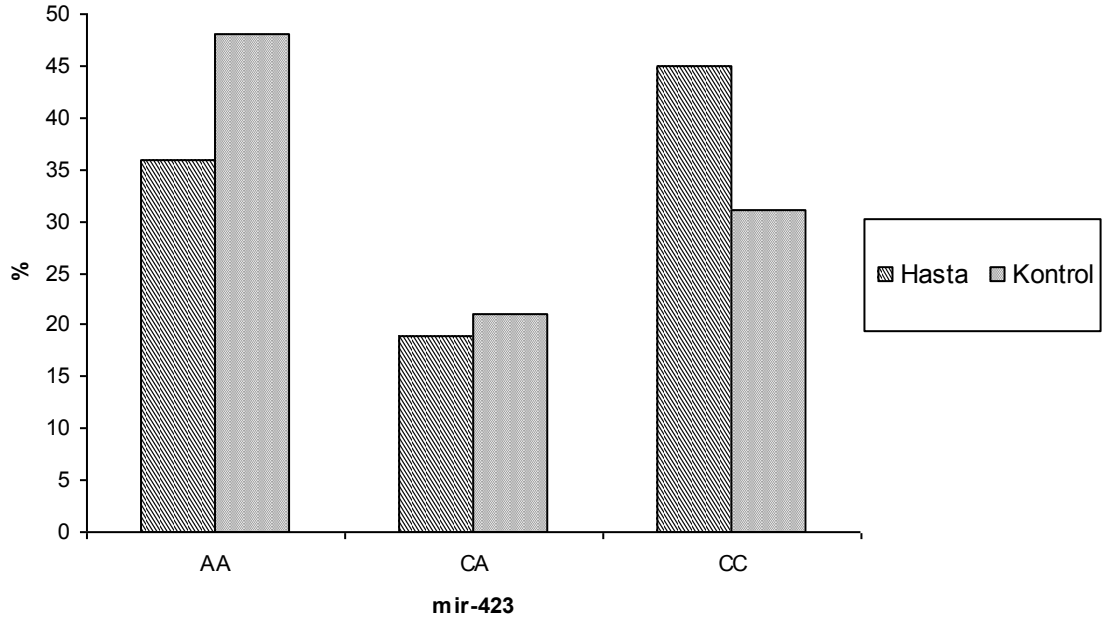
KRK'lı hastalarda

A aleli %45.5, C aleli %54.5 olarak bulunmuştur.(p=0.012). (çizelge 4.3)

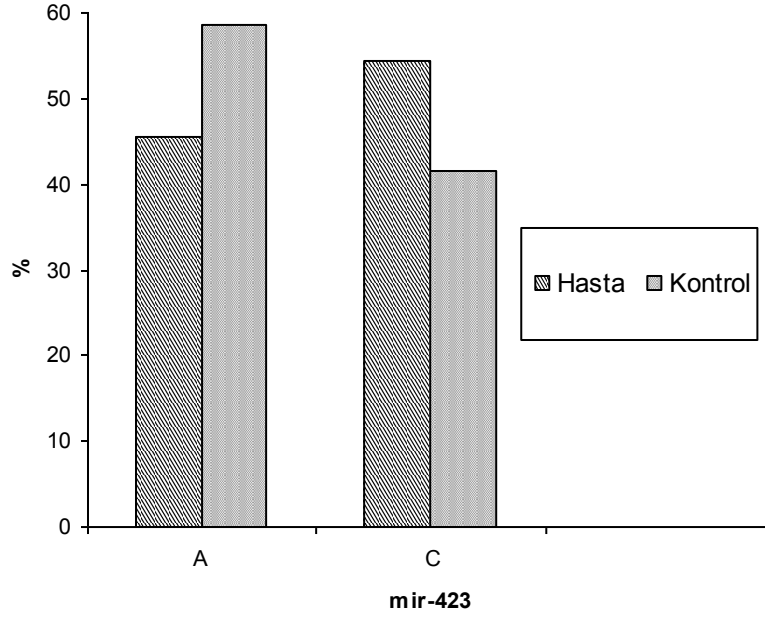
pre-miR-423 için genotip dağılımları bakımından KRK hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0,039). Hastalarda CC genotipine sahip olanların oranı, kontrol grubunda CC genotipine sahip olanların oranından 1,935 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (OR=1,935, (1,031 -3,632), p=0,040). Bu sonuca göre CC genotipe sahip bireylerde KRK riskinin arttığı belirlenmiştir. Alel dağılımları bakımından ise hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır (p=0.012).

Çizelge 4.3 pre-miR-423 (rs6505162) Polimorfizmi Genotip ve Alel Oranlarının Hasta ve Kontrol Grubu Arasındaki Dağılımı (N: alel ve genotip sayısı)

Genotip	Kontrol N (%)	Hasta N (%)	P Değeri	OR	Güven Aralığı (%95)	P değeri
AA	48 (%48)	36 (%36)	0,039	Referans		
CA	21(%21)	19(%19)		1,206	0,566-2,570	0,627
CC	31 (%31)	44 (%45)		1,935	1,031-3,632	0,040
Allel						
A	117 (%58,5)	91 (%45,5)	0,012	0,592	0,399-0,879	0,009
C	83 (%41,5)	109 (%54,5)				



Şekil 4.1. pre-miR-423 A/C (rs6505162) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile KRK'li Hasta Grubu Arasındaki Dağılımı



Şekil 4.2. pre-miR-423 A/C (rs6505162) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile KRK Hasta Grubu Arasındaki Dağılımı

4.3. pre-miR-608 (C/G) rs4919510 Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile Hastalar Arasındaki Dağılımı ve KRK İle İlişkisi

Yapılan istatistiksel analizde, hasta ve kontrol grubunun pre-miR-608 gen polimorfizmi açısından ‘Hardy Weinberg ‘ dengesinde olmadığı saptanmıştır ($p<0,001$).

Çizelge 4.4 Hardy Weinberg Denge Kontrolü (pre-miR-608)

	Genotipler	Gözlenen değer	Beklenen değer	P değeri
Kontrol	CC	43	26,01	<0,001
	GC	16	49,98	
	GG	41	24,01	
Hasta	CC	49	31,92	<0,001
	GC	15	49,16	
	GG	36	18,92	

pre-miR-608 rs4919510 (C/G) polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile KRK hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,395$).

KRK hastaları ile kontrol grubundaki bireylere ait genotip sıklıkları incelendiğinde;

CC genotipinin görülme sıklığı; KRK’ lı hastalarda % 49, kontrol grubunda % 43 olarak;

GC genotipinin görülme sıklığı; KRK’ lı hastalarda % 15, kontrol grubunda % 16 olarak;

GG genotipinin görülme sıklığı; KRK’ lı hastalarda % 36, kontrol grubunda ise % 41 olarak bulunmuştur.

Sonuçlar allel sıklığı açısından oransal olarak incelendiğinde;

Kontrol Grubunda:

C aleli %51, **G** aleli %49 olarak

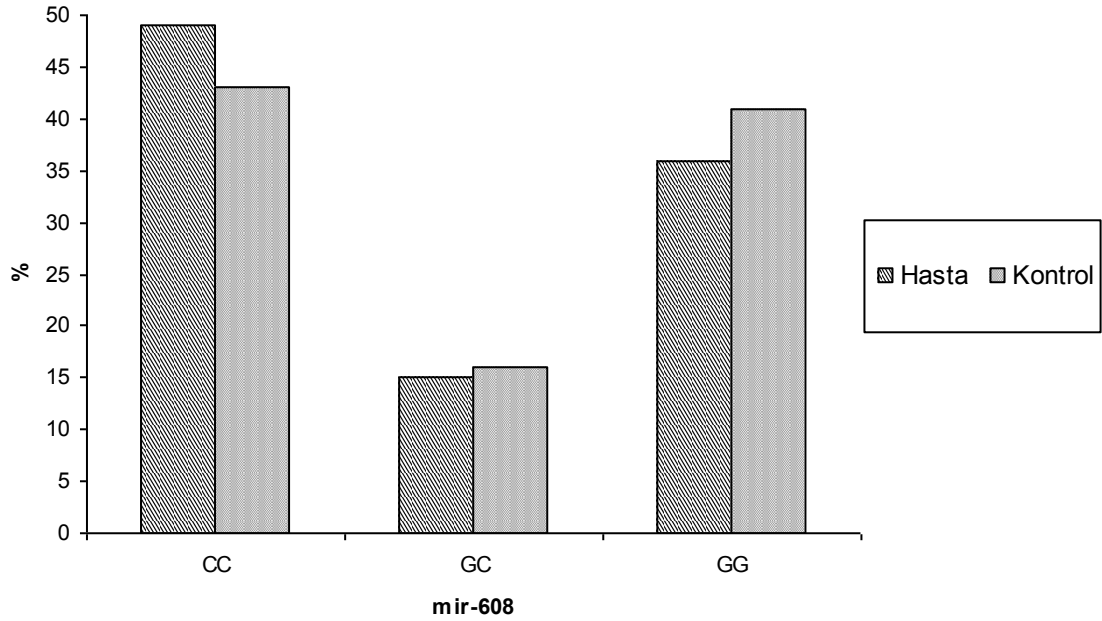
KRK’ lı Hastalarda

C aleli %56.5 , **G** aleli %43.5 olarak bulunmuştur.

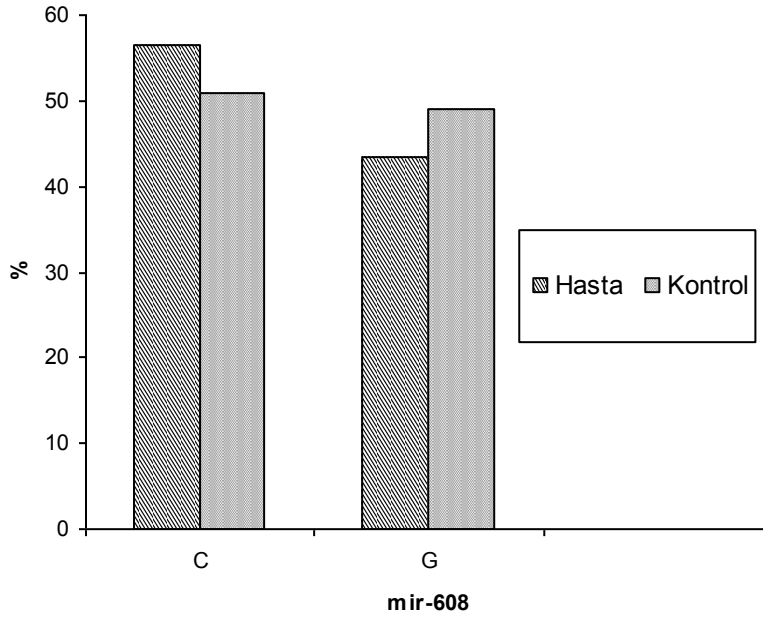
pre-miR-608 için alel dağılımları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (p=0,316).

Çizelge 4.5 pre-miR-608 (rs4919510) Polimorfizmi Genotip ve Alel Oranlarının Hasta ve Kontrol Grubu Arasındaki Dağılımı

Genotip	Kontrol N (%)	Hasta N (%)	P Değeri	OR	Güven Aralığı (%95)	P değeri
CC	43 (%43,0)	49 (%49,0)	0,395	Referans		
GC	16 (%16,0)	15 (%15,0)		0,823	0,364-1,858	0,639
GG	41 (%41,0)	36 (%36,0)		0,770	0,420-1,413	0,399
Allel						
C	102 (%51,0)	113 (%56,5)	0,316	1,248	0,842-1,850	0,270
G	98 (%49,0)	87 (%43,5)				



Şekil 4.3. pre-miR-608 C/G (rs4919510) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol grubu ile KKK Hasta Grubu Arasındaki Dağılımı



Şekil 4.4. pre-miR-608 C/G (rs4919510) Polimorfizmine Ait Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ile KKK Hasta Grubu Arasındaki Dağılım

4.4 KKK Gelişiminde pre-miR-423 ve pre-miR-608 Genlerinin Ortak Etkisi

pre-miR-423 ve pre-miR-608 genotiplerinin ortak etkisiyle KKK gelişme olasılığını saptamak için, her iki genin hasta ve kontrol gruplarındaki genotip kombinasyonları ile KKK oluşumu arasındaki ilişki kıyaslanmıştır. Her iki gruptaki yabancıl (wild) tiplerin kombinasyonu referans grup olarak kabul edilerek homozigot ve heterozigot bireylerde pre-miR-423 AA, CA, CC ile pre-miR-608 CC, CG, GG genotipleri kombine edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak her iki pre-miR genlerindeki SNP'lerin genotip kombinasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapılan çalışmaya göre bu iki genin birlikte etkisinin KKK gelişiminde bir risk oluşturmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.6: pre-miR genotip sıklıkları ile kolorektal kanser gelişme riski arasındaki ilişki

Pre-miR 423	Pre-miR 608	Kontrol n(%)	Hasta n(%)	OR (Güven Aralığı)	p
AA	CC	%14	% 17	1 (Referans)	-
AA	CG	%4	% 5	1,029(0,231-4,581)	0,969
AA	GG	%15	% 23	1,263(0,483-3,301)	0,634
CA	CC	%10	% 6	0,494(0,144-1,698)	0,263
CA	CG	%3	% 4	1,098(0,209-5,750)	0,912
CA	GG	%7	% 9	1,059(0,314-3,568)	0,926
CC	CC	%19	%13	0,563(0,207-1,530)	0,260
CC	CG	%9	% 6	0,549(0,157-1,920)	0,348
CC	GG	%19	%17	0,737(0,281-1,931)	0,534

5. TARTIŞMA

KRK, tüm dünyada önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olup, günümüzde gastrointestinal sistem kanserleri arasında görülme sıklığı açısından ilk sırada yer almaktadır (2). Kolon kanserleri, kansere bağlı ölüm nedenleri açısından ön sıralarda yer almasına rağmen, erken tanı ile tedavisi yapılabilecek tümörlerdendir (91). Son yıllarda tanıda kullanılan yöntemler gelişmekte olup tarama programları da yaygın şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Ayrıca yeni cerrahi tekniklerle radyoterapi ve sistemik tedavide yeni yöntemlerin kullanılması ile kolon kanserinin daha erken evrelerde yakalanması ve daha yüksek sağkalım oranlarının elde edilmesi sağlanmıştır (92).

KRK'nın moleküler patogenezinin aydınlatılmasında protein kodlamayan ve genlerin ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen miRNA molekülleri tanımlanmıştır. pre-miRNA'lardaki SNP'ler, miRNA'ların işlenmesini ve olgunlaşma sürecini etkilediğinden hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte etkili olan önemli moleküllerdir. Kolorektal kanser patogenezinde rol alan miRNA'lar birçok onkogenik ve tümör süpresör yolun regüle edilmesini sağlamaktadır (93).

Yapılan bir araştırmada, pre-miRNA'ların mutasyon açısından son derece iyi korunmuş ve işlevsel olabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre Hu ve ark. (13) pre-miR-423'ünde içinde bulunduğu yaklaşık 400 insan pre-miRNA'larını ve bunlara yakın bölgelerdeki genleri taramışlardır ve pre-miRNA genlerinin çevrelerindeki bölgeye kıyasla daha az sayıda SNP' e sahip olduğunu saptamışlardır.

pre-miRNA'lardaki SNP'lerin meme, prostat, akciğer, özofagus ve karaciğer kanseriyle ilişkili olduğu gözlenmiştir (94). Ayrıca birçok yeni çalışma, pri-miRNA ve miRNA bağlanma bölgelerindeki SNP'lerin KRK oluşma riski ve hastalığın ilerlemesi ile ilgili olduğunu göstermiştir. Calin ve ark. (95) kronik lenfosit lösemi hücre transformasyonu ve kanser gelişiminde etkili mutasyonlarda pri ve pre-miRNA bölgelerini tanımlamışlardır. Lee ve ark.'ları (96) 426 Koreli KRK hasta

populasyonunda pre-miR-423 ve pre-miR-608 'inde içinde bulunduğu yaklaşık 40 miRNA SNP bölgesini çalışmışlar ve bu polimorfizmlerin KRK gelişiminde ilişkili olmadığını saptamışlardır. Bir başka çalışmada Boni ve arkadaşları 5-Fluorasil ve irinotekan ile tedavi edilen 61 metastatik kolon kanserli hastada pri-miR-26a1 ve pri-miR-100 gen bölgesine ait SNP'lerin tedavide klinik yanıt ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (97). Xing ve ark.'ları (17) Çin populasyonunda yapmış oldukları çalışmada, kolorektal kanser tanısı konmuş 408 hastada 7 farklı pre-miRNA SNP bölgelerini tarayarak pre-miR-423 ve pre-miR-608'ün kolorektal kanser gelişiminde etkili olduğunu saptamışlardır. Çalışılan bu iki SNP'nin sonuçları diğer çalışmalarından farklıdır. Örneğin pre-miR-423 rs6505162'nin ovaryum kanseri riskini arttırabileceği rapor edilmiştir (90). Ayrıca üç farklı çalışmada ise özefagus kanseri, prostat kanseri ve renal hücre karsinomu riskini azalttığı raporlanmıştır (94-96).

Literatür taraması sonuçlarına göre Türk toplumunda KRK'lı hastalarda pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) polimorfizimlerini inceleyen bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu çalışmada; KRK ile ilişkili olduğu düşünülen pre-miR-423 ve pre-miR-608 gen polimorfizminin hastalıkla ilişkisi incelenmiştir.

pre-miR423'teki A'nın C'ye dönüşümü, pre-miRNA'lardaki SNP'lerin, olgun miRNA üzerine etkileri temel alındığında, miR423'ün işlenmesi ve ekspresyonunda etkili olması mümkündür. Günümüzde yapılan birçok çalışmaya göre miR-423'ün olgun formlarının ekspresyon değişimi birçok hücre büyümesi, farklılaşması ve kanser oluşumunda rapor edilmiştir (87-101).

İlk olarak 2004 yılında, tedavi edilemeyen HL-60 lösemi hücrelerinde 2-O-tetradekanoylporbol-13-asetat ile yapılan farklılaşma deneyleri sırasında miR-423'nin olgun miRNA'ların farklılaşma süreçlerini etkilediği gösterilmiştir (87).

2008 yılında ise miR423 olgun miRNA olarak nöroblastoma dokularında ve hücre hattında RNA klonlama ve Northern blot yöntemleriyle tespit edilmiş olup, miR423'ten gelişen olgun miRNA'ların değişen ekspresyonu baş ve boyun kanseri, meme kanseri ve kolorektal kanser gibi birçok multipl kanser tiplerinde rapor edilmiştir (14-15).

Yaptığımız çalışmada kolorektal kanser oluşumunda ilişkili olduğu düşünülen pre-miR-423 rs6505162 (A/C) polimorfizmi için genotip oranları değerlendirildiğinde; KRK hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır (p=0,039).

Hastalardaki mutant CC genotipine sahip olanların oranının kontrol grubundakilere göre 1,935 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre CC genotipine sahip bireylerde KKK gelişme riski artmaktadır.

Xing ve ark.'ları (17) Çin popülasyonunda yapmış oldukları çalışmada, kolorektal kanser tanısı konmuş 408 hastada farklı pre-miRNA SNP bölgelerini tarayarak rs6505162 (A/C) polimorfizminin kolorektal kanser gelişiminde etkili olduğunu bulmuşlardır (p=0.001).

Hastalarda AA, CA, CC genotip oranlarını sırasıyla % 59.3, % 34.5, % 6.1, kontrol grubunda ise % 50, % 42.5, % 7.4 olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise AA, CA, CC genotip oranları hastalarda sırasıyla % 36, % 19, % 45 olarak, kontrol grubunda ise % 48, % 21, % 31 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla Xing ve ark.'larının sonuçları uyumlu olarak rs6505162 SNP'sinin KKK gelişme riskini arttırdığı saptanmıştır (p=0.040).

Lee ve ark. (96) KKK tanısı konmuş 426 Koreli hastada, miRNA biyogenez yolağında rol alan 23 SNP, 7 pre-miRNA ve 10 pri-miRNA SNP'si olmak üzere 40 miRNA polimorfizmi ile KKK arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. rs6505162 A/C, rs4919510 C/G polimorfizimleri dahil olmak üzere çalışması yapılan tüm SNP'lerin KKK gelişiminde etkili olmadığını saptamışlardır. KKK ile rs6505162 polimorfizmi arasındaki ilişkiyi inceleyen ulaşabildiğimiz iki çalışma bulunmaktadır. Yapılan iki çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışma bizim çalışma sonuçlarımızı desteklerken diğer çalışmada sonuçlarımızı desteklemeyen bulgular elde edilmiştir. Yapılan her iki çalışmada etnik kökenlerinin ve çalışma gruplarının aynı olmasına rağmen birbirini desteklememektedir. Bu konudaki çelişkileri gidermek amacıyla farklı popülasyonlarda ve çok sayıda çalışmalara gereksinim vardır.

Farklı kanser türlerinde özellikle yumurtalık meme ve özofagus kanserlerinde yapılan çalışmalarda rs6505162'nin kansere yatkınlıkta etkili olduğu saptanmıştır. Bununla ilgili çalışmalar Ye ve arkadaşları (98) tarafından yapılmış, 346 Kafkas popülasyonunda özofagus kanseri tanısı konmuş hastalarda C allelinin hastalık riskini önemli derece azalttığını saptamışlardır.

Kontorovitch ve ark. (90) Aşkenazi Yahudi popülasyonunda yaptıkları çalışmada rs6505162'nin CC genotipinin meme kanserinde BRCA2 mutasyonu taşıma riskini arttırdığı ve ovaryum kanseri riskini yükselttiğini saptamışlardır. Ayrıca miR423

ve BRCA2'nin interaksiyonun farklı genotip etkilerini yansıtabileceğini rapor etmişlerdir.

Smith ve arkadaşlarının (89) Kafkas popülasyonunda 193 meme kanseri tanısı konmuş kadın hasta ve 193 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda pre-miR-423 rs6505162 polimorfizmini incelemişler ve çalışma sonucunda rs6505162 (A/C) C alleli insidansının kontrol grubunda hasta grubuna kıyasla daha fazla olduğunu bulmuşlardır. AA ve AC genotipinin meme kanseri gelişme riskini artırırken CC genotipinin hastalık riskini azalttığını saptamışlardır. Smith ve ark.'larının çalıştıkları popülasyon ile Kontrovitch ve ark.'larının farklı olduğu için benzer sonuçlar elde edilmemiş olabilir.

Wang ve ark. (101) miRNA ile ilgili polimorfizmlerin özofagus hücre karsinomundaki etkisini araştırmışlardır. Çalışma grupları 1565 Güney Afrikalı bireyden oluşup, bunların 565'i özofagus kanserli hasta, 1000'i kanser tanısı konmamış sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Yaptıkları çalışma sonucunda miR-423 gen bölgesine ait rs6505162 polimorfizminde C alel sıklığını hastalarda % 22,8, kontrolde % 18,2 olarak belirlemiş olup C alleli taşıyan bireylerde özofagus kanser gelişme riskinin arttığını saptamışlardır (p=0.012).

miR608'in, fonksiyonu tam olarak bilinmemekte olup tümör supressör miR olduğu düşünülmektedir. pre-miR-608 rs4919510 SNP bölgesindeki C-G polimorfizmi birçok popülasyonda yaygın olarak bulunmaktadır (16). pre-miR-608, kromozom 10q24 lokusundaki heterozigotluk kaybı sonucu oluşan kolorektal, prostat, pankreas ve beyin gibi birçok insan kanserlerinde rapor edilmiştir.

miR608'in ayrıca kolorektal kanserin seyrinde etkili olan ACDC (Adiponectin and Collagen domain containing), CD4 (CD4 antigen), GHR (Growth hormone receptor), RXRB (retinoic X receptor-b) ve TP53 (tumor protein p53)'ün hedef bölgelerine bağlandığı tahmin edilmektedir. TP53 mutasyonu taşıyan ve 3. evrede olan KRK hastalarının, 5-Fu'e dayalı kemoterapiden faydalandıkları bildirilmiştir (102).

Yaptığımız çalışmada, kolorektal kanser oluşumunda ilişkili olduğu düşünülen pre-miR-608 rs4919510 (C/G) polimorfizmi için genotip oranları değerlendirildiğinde; KRK hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,395). Allel frekansları ise C alleli için hastalarda % 56.5, kontrol grubunda % 51 olarak, G alleli için hastalarda % 43.5, kontrol grubunda ise % 49 olarak belirlenmiştir ve anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0,316).

Ryan ve arkadaşlarının (18) Afro-Amerikanlar ve Kafkasları içeren KRK tanısı konmuş 245 hasta ve 446 kontrolde yaptıkları çalışmada, rs4919510 polimorfizminin kolorektal kanser oluşumunda risk oluşturmadığını belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada hastalarda CC, CG ve GG genotip oranları sırasıyla % 52, % 40, % 8, kontrol grubunda ise sırasıyla % 53, % 38, % 8 olarak bulmuşlardır. Bu çalışma bizim bulgumuzu destekler niteliktedir. Ancak hastalardaki sağkalım oranlarına baktıklarında mutant GG genotipinin Afro-Amerikalılarda yaşam süresini kısalttığını (p=0.059) Kafkaslarda ise artırdığını tespit etmişlerdir (p=0.046).

Xing ve ark.'ları (17), Çin popülasyonunda 408 kolorektal kanser hastasında rs4919510 (C/G) SNP'nin kolorektal kanser ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (p=0.027). Yaptıkları çalışmada hastalarda CC, CG ve GG genotip oranlarını sırasıyla % 30, % 52.2, % 17.6, kontrol grubunda ise % 35.3, % 47.3, % 17.2 olarak bulmuşlardır. Yaptığımız çalışmada ise CC, CG ve CG genotipleri hastalarda sırasıyla % 49, % 15, %36, kontrol grubunda ise % 43, %16, %41 olarak bulunmuştur ve hastalıkla bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır (p=0.39). Ayrıca Xing ve ark. C allel varyantının, hücrenin genel sağkalımını ve hastalığın tekrar nüksekme riskini azaltırken, G alelinin hastalıkla ilişkili olmadığını belirlemişlerdir.

Lin ve ark. (103), 1097 kolorektal adenokarsinomlu hastalarda 26 miRNA'da 41 SNP bölgesini araştırdıkları çalışmada, miR608 rs4919510 SNP bölgesinde CG ve GG genotiplerinin KRK'de tekrarlama ve ölüm riskini artırdığını saptamışlardır (p=0.004). Çalışmamızdaki örneklem büyüklüğünün daha az olması, Lin ve ark.'nın çalışmalarından farklı sonuçlar elde etmemize neden olmuş olabilir.

Yapılan literatür taraması sonucunda rs4919510 SNP bölgesi ile kolorektal kanser arasındaki ilişkiyi araştıran başka bir çalışmaya ulaşamadığımızdan farklı kanserlerdeki etkisi açısından bakıldığında;

Horikawa ve ark. (104) Kafkas popülasyonunda 278 kontrol ve 279 renal karsinomlu hastada miRNA biyogenezinde rol alan 11 gen bölgesine ve 15 miRNA' a ait toplam 40 farklı SNP' e bakmışlar ve pre-miR-608 rs4919510 (C/G) bölgesinin renal karsinom gelişiminde risk faktörü olmadığını saptamışlardır.

Ye ve ark. (98) Kafkas popülasyonunda özofagus kanser tanısı konmuş 346 hasta ve 346 kontrolle yaptıkları çalışmada 26 miRNA'da 41 SNP bölgesi araştırmışlar

ve rs4919510 (C/G) SNP'sinin özofagus kanser gelişiminde anlamlı olmadığını bulmuşlardır.

Ji Huang ve ark. (105) yaptıkları çalışmada miRNA608'deki rs4919510 C/G polimorfizminin, Her2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2)'yi etkileyerek meme kanseri ve tümör oluşum riskini artırdığını saptamışlardır. CG ve GG genotip varyantlarını taşıyan hastalarda HER2 kaynaklı tümör oluşumuna daha sık rastlamışlardır. Bu çalışmadan yola çıkarak Ma ve ark. (106) Çin Populasyonunda yaptıkları çalışmada HER2 (Human Epidermal Growth Faktör Reseptör), progesteron reseptör (PR) ve östrojen reseptörlerinin (ER) yokluğunda gelişen meme kanserinde miRNA'ların etkisini araştırmışlardır. 191 meme kanseri hasta ve 192 kontrol bireyinde yaptıkları çalışmada 22 miRNA SNP bölgesine bakmışlardır, pre-miR-423 rs6505162 ve pre-miR-608 rs4919510 dahil olmak üzere diğer bütün miRNA SNP'lerin hastalıkla ilişkili olmadığını saptamışlardır.

Çalışmamızda rs6505162 ve rs4919510 SNP'lerinin KRK oluşumunda ortak etkilerini saptamak amacıyla kombinasyon analizi yapılmıştır. Yapılan analizde homozigot ve heterozigot bireylerde pre-miR-423 ve pre-miR-608 polimorfizimleri için sırasıyla CC, CG, GG genotipleri ile AA, CA, CC genotipleri kombine edilmiştir. Homozigot yabancı genotipler referans grup olarak belirlenmiş ve her iki genin birlikte etkisi sonucu KRK gelişiminde risk oluşturmadıkları saptanmıştır. Xing ve ark.'ları (17) da bu iki SNP'nin KRK oluşumu üzerindeki ortak etkisini araştırmışlardır. Homozigot yabancı genotipleri referans grup kabul etmişler ve yaptıkları analiz sonucunda rs6505162 için AC-CC ve rs4919510 için CG-GG genotiplerinin kombine etkilerinin KRK oluşma riskini arttırdığını saptamışlardır ($p=0.001$). Xing ve ark.'larının çalışma grubundaki birey sayısının bizim çalışmamızdaki birey sayısından daha fazla olması farklı sonuçlar elde etmemize neden olmuş olabilir.

pre-miR-423 rs6505162 ve pre-miR-608 rs4919510 SNP'lerinin KRK ile ilişkisini inceleyen literatür bilgisi sınırlıdır, fakat farklı kanserlerle yapılan çok sayıda çalışma vardır. Bu çalışmaların çoğunda birbiriyle çelişkili sonuçlar gözlenmektedir. Bu çelişkili sonuçlardan, yapılan çalışmalardaki populasyon farklılıkları, örneklem büyüklükleri ve farklı kanser tiplerine özgü biyolojik fonksiyonlar sorumlu olabilir.

KRK'ların genetik ve çevresel faktörlerin rol aldığı multifaktöriyel kanserler olması nedeniyle bu faktörlerin hasta ve kontrol grupları arasında ne derecede etkili

olduğu bilinmemektedir. Bunun yanı sıra sadece pre-miR-423 ve pre-miR-608 polimorfizmleri değil KKK etiyolojisinde rol alan diğer genlerle birlikte daha kapsamlı bir çalışma yapılırsa daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

Çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız örneklem genişliğinin büyük olmaması, allel frekansı ve genotip dağılımları ile hastalık arasındaki ilişki popülasyonu yansıtmayabilir. Bu nedenle anlamlı bulduğumuz ilişkilerin doğrulanması için bu araştırmadan bağımsız daha geniş bir örneklem grubunda yapılacak çalışmalar literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

Çizelge.5.1.Yapılan Çalışmalarda pre-miR-423 ve pre-miR-608 Gen Polimorfizmlerinin Kolorektal Kanseri ve Diğer Kansellerle İlişkisi.

Yazar ve Yıl	Çalışma Populasyonu	SNP'ler	Sonuç
Lee ve ark-2010	426 KKK Hasta (Koreli)	40 miRNA ile ilgili polimorfizm	pre-miR-423 ve pre-miR-608 KKK gelişiminde anlamsız.
Xing ve ark- 2012	408 KKK Hasta (Çin)	7 farklı pre-miR-SNP	pre-miR-423(p=0.001) C alleli hastalık riskini artırdığı saptanmış pre-miR-608 (p=0.001) G alelinin hastalık riskini artırdığı saptanmış
Ryan ve ark -2012	446 kontrol, 245 KKK'li hasta (Afro-Amerikan ve Beyaz Irk)	miR-608 rs4919510	pre-miR-608 KKK gelişiminde anlamsız (p=0.831)
Lin ve ark.-2012	1097 KKK Hasta (Amerika)	26 miRNA ile ilgili 41 SNP bölgesi	pre-miR-608 CG ve CC genotipleri hastalık tekrar riskini artırıyor (p=0.004)
Diğer Kansellerle İlişkisi			
Ye ve ark- 2008	346 kontrol ve 346 Özofagus Kanseri Hasta (Beyaz Irk)	26 miRNA ile ilgili 41 SNP bölgesi	pre-miR423 rs6505162 (A/C) C alleli hastalık riskini azalttığı saptanmış (p<0.0001)
Wang ve ark- 2013	1000 kontrol ve 193 Özofagus Kanseri Hasta (Beyaz ırk)	3 miRNA SNP	pre-miR423 rs6505162 (A/C) CC genotipinin hastalık riskini artırdığı gözlenmiş (p=0.012)

Smith ve ark -2012	193 Kontrol ve 193 Meme kanserli hasta (Beyaz Irk)	miR-423 rs6505162	rs6505162(A/C) AA ve AC genotipleri meme kanseri riskini artırırken CC genotipiın azallığı gözlenmiş (p=0.035)
Ji- Huang ve ark-2012	1434 kontrol ve 1138 meme kanserli hasta	pre-miR-608 rs4919510	rs4919510polimorfizminin HER2(Human Epidermal Growth Faktör Reseptör-2)'yi etkileyerek meme kanseri ve tümör oluşma riskini artırdığını saptamışlar (p=0.006)
Ma ve ark-2013	192 Kontrol ve 191 meme kanserli hasta (Çin Populasyonu)	22 miRNA ile ilgili 23 SNP	pre-miR-608 rs4919510 polimorfizminin meme kanseri ile ilişkili olmadığı gözlenmiş.
Horikowa ve ark-2008	346 Kontrol ve 346 Renal Hücre Karsinomlu Hasta(Beyaz ırk)	11 miRNA oluşum genleri ve 15 miRNA genleri ile ilgili 40 SNP	pre-miR-423 ve pre-miR-608 'in Renal hücre karsinomu ile ilişkili olmadığı gözlenmiş.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kolorektal kanser, tüm dünyada yaygın görülen kanserler arasında olup, yüksek oranda ölümlerine sonuculanmaktadır. Kolon tümörleri yavaş büyümeyle olup semptomatik hale geldiklerinde genellikle hastalık ileri evreye varmış durumdadır. Hastaların sadece % 40'ında KRK tanısı erken evrede (lokalize hastalık evresi) konulmaktadır. KRK'deki prognoz ise tanı konulduğunda hastalığın evresiyle yakından ilişkilidir. Çevresel ve genetik faktörler KRK'nin gelişme olasılığını arttırmaktadır. KRK'lerin çoğunluğunu sporadik vakalar oluşturmaktadır. Erken tanı ve tedavi yöntemlerinin gelişmesi ile kolon kanserlerinden ölüm oranları giderek azalmaktadır.

Yapılan bu çalışmada, kolorektal kanser patogeneğinde etkili olduğu düşünülen olgun miRNA'ların işlenmesini ve olgunlaşma sürecini etkileyen pre-miRNA'lardan pre-miR-423 (rs6505162) ve pre-miR-608 (rs4919510) gen bölgesindeki polimorfizmlerin KRK ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda pre-miR-423 A/C polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında; KRK hastaları ile kontrol grubu arasında genotip dağılımları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu saptanmıştır ($p=0,039$). Hastalarda CC genotipine sahip olma olasılığı kontrol grubuna göre 1,9 kat daha fazladır ($OR=1,935$, $(1,031 -3,632)$, $p=0,040$). pre-miR-608 C/G polimorfizmine ait genotip oranları karşılaştırıldığında ise; kontrol grubu ile KRK hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ve dolayısıyla pre-miR-608 C/fG değişiminin kolorektal kanser riskini arttırmadığı belirlenmiştir ($p=0,395$). Ayrıca rs6505162 ve rs4919510 SNP'lerinin KRK oluşumunda ortak etkilerini saptamak için kombinasyon analizi yapılmıştır. Homozigot ve heterozigot bireylerde pre-miR-423 polimorfizmi için AA, CA, CC genotipleri ile pre-miR-608 polimorfizmi için CC, CG, GG genotipleri kombine edildiğinde her iki genin birlikte etkisi sonucu KRK gelişme riskinin olmadığı saptanmıştır.

Çalışmamız, Türk toplumunda kolorektal kanser ile pre-miR-423 ve pre-miR-608 gen polimorfizminin araştırılması konusunda ilk çalışmadır. Bu araştırmadan bağımsız daha geniş örneklem grubunda ve farklı populasyonlarda bulguların

tekrarlanması faydalı olacaktır. Ayrıca KKK'lerin oluşumu multifaktöriyel olduğundan genetik faktörlerin ne derecede önemli olduğu bilinmemektedir. pre-miR-423 ve pre-miR-608 polimorfizmlerinin dışında KKK etiolojisinde rol alan diğer genlerle birlikte kapsamlı çalışma yapıldığında daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Rosai J: Ackerman's Surgical Pathology. In Rosai J.** Gastrointestinal Tract, Large Bowel. 9th ed. Mosby Company; China, **2004**: 776- 823
2. **Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* **2011**; 61: 69–90.
3. **Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E.** Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* **2009**;59:366–78.
4. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı 2006-2008 yılları Türkiye Kanser İnsidansı.
5. **Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, et al.** Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* **2007**;121:2065–72
6. **Emel Canbay, Dursun Buğra** ‘Kolorektal kanser: Genetik ve moleküler biyoloji araştırmaları hasta tedavisine yeterince yansıyor mu?’ *Ulusal Cerrahi Dergisi.* **2011**; 27(4): 198-205
7. **Köksal F,** Kolorektal karsinogenezde mikro RNA’ nın rolü. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, **2011**
8. **Iwai N,** Naraba H, Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochem-Bioph. Res. Co.* **2005**; 331:1439-44
9. **Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci.* **2010**; 101: 2309-2315.
10. **Faber C, Kirchner T, Hlubek F.** The impact of microRNA’s on colorectal cancer. *Virchows Arch.* **2009**; 400:359-367
11. **Nagel R, Le Sage C, Diosdado B, Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R.** Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer res.* **2008**; 68: 5795-5802
12. **Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al.** MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *Jama* **2008** ; 299: 425–36.

13. **Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al.** Genetic variants of miRNA sequences and non—small cell lung cancer survival. *J Clin Invest.* **2008**;118:2600–8
14. <http://www.targetscan.org>. Erişim tarihi. 21.12.2013
15. **Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG and Knuutila S:** CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma – A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* **2009**;48(7): 615-623
16. **Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, Perez-Ordonez B, Jurisica I, O’Sullivan B, Waldron J, Gullane P, Cummings B and Liu FF.** Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res,* **2010**;16(4): 1129-1139
17. **Xing J., Wan S., Zhou F, Qu F., Li B, Myers E., Xiaoying Fu, Palazzo P., He X, Chen Z., Yang H.** Genetic polymorphisms in pre-microRNA genes as prognostic markers of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2012** ; 21(1): 217–227.
18. **Ryan B.M., Andrew C. McClary, Nicola Valeri, Dillon Robinson, Alessio Paone, Elise D. Bowman1, Ana I. Robles, Carlo Croce, Curtis C. Harris.** rs4919510 in hsa-mir-608 Is Associated with Outcome but Not Risk of Colorectal Cancer. *Plos One.***2012**;7:1-6
19. **AKKIZ H.** Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics **2009**;2(3):5-12
20. <http://kolonkanseri.blogspot.com.tr/p/kolorektal-kanser-nedir.html>. Erişim tarihi. 08.12.2013
21. **Winawer SJ, Sherlock P.** Best practice and research clinical gastroenterology Colorectal cancer screening, **2007**; 21, 6: 1031.
22. http://www.kanser.gov.tr/Dosya/tarama/kolorektal_kanser_tarama_programi.pdf. Erişim Tarihi.24.10.2013
23. **Atlanta, GA.** American Cancer Society. Cancer Facts & Figures; **2007**
24. **Willard F,** PhD Thompson &Thompson Genetics in Medicine Güneş Kitabevi; **2005.**
25. **Bresailer RS.** Malignant and premalignant lesions of the colon. In Current Diagnosis and Treatment in Gastroenterology. Eds:Friedman SL, McQuaid KR,Grendell JH.McGraw Hill, New York, **2003** :407-435.
26. **Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, et al.** Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res .***2004**;10(12): 4015-21.

27. **Dönmez H, Demirezen Ş., Beksaç M.,** Cytoplasmic Biomolecules Of Wnt/Beta-Catenin Signaling Pathway. *Marmara Medical Journal*, **2012**: 053-057
28. **Spink KE, Polakis P, Weis WI.** Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction. *EMBO J.* **2000**;19:2270-2279
29. **Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF.** The ABC of APC. *Human Molecular Genetic.* **2001**;10:721-733.
30. **Kikuchi A, Willert K, Jones KA.** Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal* **1999**;11:777-788. Wnt signaling: is the party in the nucleus *Genes Dev.* **2006**;20:1394-1404
31. **Brocardo M, Henderson BR.** APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond. *Trends Cell Biol.* **2008**;18:587-596
32. **Hanson CA, Miller JR.** Non-traditional roles for the Adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein *Gene* **2005**;361:1-12
33. **Imura T, Wang X, Noda T et al.** Adenomatous polyposis coli is essential for both neuronal differentiation and maintenance of adult neural stem cells in subventricular zone and hippocampus. *Stem Cells.* **2010**; 28: 2053-2064.
34. **Segditsas S, Rowan AJ, Howarth K.** APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene* **2009**;28:146-155.
35. **Büyükdoğan M.** Kolorektal Kanserde Genetik ve Etyolojik Faktörler. *Selçuk Tıp Dergisi*, **2009**;25:171-180
36. **Sachse C, Gillian S, Murray JV et al. and Colorectal Study Group,** A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* **2002**; 23,1839-1845.
37. **Büyükdoğan M.** Kolorektal Kanserlerde Genetik ve Etyolojik Faktörler. **2005**; 25:171-180.
38. **Andreyev HJ, Norman AR, Oates J.** Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer. *Br J cancer.* **2001**; 85:692-6.
39. <http://www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/kalin-barsak-kanseri-kolon-kanseri-kolorektal-kanser>. Erişim tarihi. 4.12.2013
40. <http://www.kansergenetigi.com/tr/familyal-adenomatoz-polipozis-koli-fap>. Erişim tarihi.12.11.2013

41. **Topuz E, Aykan F.N.** Sindirim Sistemi Kanseri, İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları **1998**; 373-475.
42. **Gardner E.J., Richards R.C.:** Multiple Cutaneous and Subcutaneous Lesions Occurring Simultaneously with Hereditary Polyposis and Osteomatosis; *Am j. Human Genetic*; **1953**;5, 139-47
43. **Turcot J., Despres J.P., St. Pierre:** Malignant Tumors of the CNS Associated with Familial Polyposis of the Colon: Report of Two Cases: *Dis Colon Rectum*: **1959**;2:465-8
44. **Paraf B.F., Jothy S., Van Meir E.G.;** Brain Tumor-Polyposis Syndrome: Two Genetic Diseases; *J. Of Clinical Oncology*: **1997**, Vol.15,No:72744-58
45. **Jamjoom Z.A., Sadiq S., Mofit A.B., Al-Mofleh I., Ajarim D.:** Turcot Syndrome: Report of a Case and Review of the Literature: *Int. Surg.* **1989**; 74: 45-501
46. **Wirtzfeld Da, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA.** Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Am Surg Oncol.* **2001**; 8, 319-327.
47. **McGarrity TJ, Kulin HE, Zaino RJ.** Peutz-Jeghers syndrome. *Am J Gastroenterol.* **2000**, 95: 569-604.
48. **Salem OS, and Steck WD.** Cowden's disease (multiple hamartoma and neoplasia syndrome). *J Am Acad Dermatol.* **1983**, 8:686-691
49. <http://www.chop.edu/service/oncology/our-programs/hereditary-cancer-predisposition-program/genetic-syndromes-with-cancer-risks.html>. Erişim tarihi.16.11.2013
50. **Daniel ES, Ludwig SL, Lewin KJ. Et al.** Cronkhite-Canada syndrome associated: An analysis of the pathologic features and therapy in 55 patients. *Medicine* **1982**, 61: 293-298
51. **Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldgar DE, Jass JR.** World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the digestive system, Tumors of colon and rectum. *IARC. Pres* **2000**: 103-143.
52. **Paulina T., Janusz Blasiak** The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment Department of Molecular Genetics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Poland. **2012**
53. **Garzon R.** MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev.Med.* **2009**, 60, 167–179.

54. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. **1993**; 75: 843–854
55. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **2000**; 403(6772): 901-6.
56. <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>. Erişim Tarihi. 12.01.2014
57. **Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* 2010;101:2309-2315
58. **Esquela-Kerscher A, Slack FJ.** Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. **2006**; 6: 259-269
59. **Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U.** Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. **2004**; 303:95-98
60. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. **2001**;409:363-366
61. **Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R.** Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. **2005**;123:631-640
62. <http://uhrakahraman.blogspot.com.tr/2010/11/mirna-ve-kanser.html>. Erişim tarihi. 14.01.2014
63. **Rossi JJ.** RNAi and the p-body connection. *Nat. Cell Bio*. **2005**;7(7);643-645
64. **James W.F.** Catto MicroRNA in Prostate, Bladder, and Kidney Cancer: A Systematic Review, *European Urology*. **2011** (671-681)
65. **Lotterman CD, Kent OA, Mendell JT.** Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle*. **2008**; 7 (16) : 2493-9
66. **Madhu S. Kumar, Stefan J. Erkeland, Ryan E, et al.** Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *PNAS*. **2008** March; vol. 105; 10:3903-3908

67. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **2005**;120: 635-647.
68. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Lorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* **2005**;102(39):13944-9
69. Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. **2008**; 111: 3183–3189
70. Eis P, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *PNAS*. **2005**;102:3627–3632.
71. Kluvier J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. **2005**;207:243–249.
72. Volinia S, Calin G, Liu CG, et al. A microRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. *PNAS*. **2006**; 103:2257–2261
73. Eilers M, Eisenman RN. Myc's broad reach. *Genes Dev* **2008**;22(20):2755-66
74. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. **2005**;435 (7043):839-43.
75. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. **2009**; 4:199-227
76. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang CV, Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*. **2008**;40(1):43-50

77. **Faber C, Kirchner T, Hlubek F.** The impact of microRNA's on colorectal cancer. *Virchows Arch* **2009**; 400;359-367
78. **Nagel R, Le Sage C, Diosdado B, Waal M, Oude Vrielink JA, Bolijn A, Meijer GA, Agami R.** Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer res* .**2008**; 68:5795-5802.
79. **Wang JC, Zhou ZG, Wang L, et al.** Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Disease Markers*. **2009**; 26(1):27–34
80. **Chen X, Guo X, Zhang H, et al.** Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. **2009**; 28(10):1385–1392
81. **Sarver AL, French AJ, Borralho PM, et al.** Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer*. **2009**; 9, 401
82. **Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, Vrtkova I, Kocakova I, Tichy B, Dvorak J.** MicroRNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol* .**2008**; 33: 541–547
83. **Schimanski C.C, Frerichs K, Rahman F.** High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol*. **2009**; 15: 2089-2096
84. **Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu CG, Bhatt D, Taccioli C.** MicroRNA expressions patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. **2007**

85. **Gong J, Tong Y.** Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* **2012**;33:254-263.
86. **Yu Z, Li Z, Jolicoeur N, Zhang L, Fortin Y, Wang E, Wu M, Shen SH.** Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nuc. Acids Res.* **2007**;35(13):4535-4541.
87. **Kim YD, Lee JY, Oh KM, Araki M, Araki K, Yamamura K and Jun CD.** NSrp70 is a novel nuclear speckle-related protein that modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *Nucleic Acids Res.* **2011**;39(10): 4300-4314,
88. **Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve JJ, Mihailovic A, Halfwerk H, Morozov P, Brown M, Hafner M, Reyat F, van Kouwenhove M, Kreike B, Sie D, Hovestadt V, Wessels LF, van de Vijver MJ and Tuschl T.** MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res.* **2011**;71(13): 4443- 4453
89. **Smith R, Dominik J., Plamenan. Gabrovska, Stephen R. Weinstein, Larisa Haupt and Lyn R. Griffiths,** Genetic Variant Located in miR-423 is Associated with Reduced Breast Cancer Risk, *Cancer Genomics & Proteomics.* **2012**; 9: 115-118
90. **Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, Nir U, Friedman E.** Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish highrisk women. *Int J Cancer.* **2010**; 127: 589–97.
91. **Sökmen S.** Kolorektal Kanserde Prognoz, Kolorektal Özel Sayısı. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery* **2004**;9:57-65.
92. **Kuzu MA, Demirkıran A.** Kolon Kanserinin Küratif Cerrahi Tedavisi. Alemdaroğlu K, Akçal T, Buğra D (Editörler). Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. İstanbul: *Türk Kolon ve Rektum Cerrahi Derneği*; **2003**;427-50
93. **Ng EK, Chong WW, Jin H, et al.** Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* **2009**; 58:1375–1381

94. **Mishra PJ.** MicroRNA polymorphisms: a giant leap towards personalized medicine, *Per Med.* **2009** ;6(2):119-125.
95. **Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM.** A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia, *N Engl J Med.*, **2005** ; 353(17) :1793-801
96. **Lee HC, Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Kang BW, Moon JH, et al.** Prognostic impact of microRNA-related gene polymorphisms on survival of patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **2010**;136:1073–8.
97. **Boni V, Zarate R, Villa JC, Bandres E, Gomez MA, Maiello E, et al.** Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *Pharmacogenomics J*; **2010**
98. **Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, et al.** Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila Pa)* **2008**;1:460–9.
99. **Bao BY, Pao JB, Huang CN, Pu YS, Chang TY, Lan YH, et al.** Polymorphisms inside microRNAs and microRNA target sites predict clinical outcomes in prostate cancer patients receiving androgen deprivation therapy. *Clin Cancer Res* **2011**;17:928–36.
100. **Lin J, Horikawa Y, Tamboli P, Clague J, Wood CG, Wu X.** Genetic variations in microRNA-related genes are associated with survival and recurrence in patients with renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **2010**;31:1805–12.
101. **Wang Y., Vogelsang M., Schäfer G., Matejcic M., Iqbal Parker M.** MicroRNA Polymorphisms and Environmental Smoke Exposure as Risk Factors for Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *Plos One.* **2013**; 8 :1-9.
102. **Landi D, Gemignani F, Naccarati A, Pardini B, Vodicka P.** Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis.* **2008**; 29: 579–584.
103. **Lin M, Jian G, Cathy E.** Genetic Polymorphisms in MicroRNA-Related Genes as Predictors of Clinical Outcomes in Colorectal Adenocarcinoma Patients. *Clin Cancer Res.* **2012**;18:3982-3991

- 104. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J.** Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **2008**;14:7956–62
- 105. Huang A-Ji, Ke-Da Y, Jing L, Lei Fan, Shao Z.** Polymorphism rs4919510 :C>G in Mature Sequence of Human MicroRNA-608 Contributes to the Risk of HER2-Positive Breast Cancer but Not Other Subtypes. *Plos One*.**2012**;7:1-8
- 106. Ma F, Zhang P, Lin D, Yu D, Yuan P, Wang J, Fan Y, Xu B.** There Is No Association between MicroRNA Gene Polymorphisms and Risk of Triple Negative Breast Cancer in a Chinese Han Population. *Plos One* .**2013**; 8:1-8

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana’da doğdu. İlkokul ve ortaokulu Mersin’de tamamladı. Lise eğitimini Mersin Mehmet Adnan Özçelik Anadolu Lisesinde tamamladı.

2010 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2010 yılı eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.