

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEME KANSERİNİN HİSTOLOJİK VE PATOLOJİK ALT TİPLERİNİN META-
ANALİZ YÖNTEMİNE DAYALI miRNA İMZALARI İLE SINIFLANDIRILMASI

Yasemin Öztemur

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Aralık

2013

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Yasemin Öztemur

Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU danışmanlığında, Yasemin ÖZTEMUR tarafından hazırlanan bu çalışma 24/12/2013 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Özlen KONU İmza:

Üye : Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Meme Kanserinin Histolojik ve Patolojik Alt Tiplerinin Meta-Analiz Yöntemine Dayalı miRNA İmzaları ile Sınıflandırılması

Yasemin Öztemur

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

mikroRNA'lar (miRNA) gen ifadesini transkripsiyon sırasında ya da transkripsiyon sonrası düzenleyen küçük RNA molekülleridir. mikroRNA'lar, gelişim, hücre bölünmesi, hücre başkalaşması ve programlı hücre ölümü gibi biyolojik işlerde önemli roller üstlenmektedir. Bu doğrultuda değişen miRNA ifadesinin kanser gibi hastalıkların oluşumuna katkısı olması muhtemeldir ve yapılan çalışmalar miRNA'ların sadece kanser oluşumunda değil kanser gelişiminde de etkili olduklarını göstermektedir. Yoğunlaşmakta olan miRNA çalışmaları, miRNA klonlaması, kantitatif PZR ve mikrodizin gibi teknikleri kullanarak miRNA ifade profillerinin araştırılmasına olanak sağlamış ve bu araştırmaların sonucunda meme kanserinin de dahil olduğu pek çok kanser türünde anormal miRNA ifade profillerinin varlığı gösterilmiş ve onaylanmıştır.

Bu çalışma meme kanserinde miRNA mikrodizin verilerini bir araya getiren ilk meta-analiz çalışmasıdır. Meme kanseri ile ilgili şimdiye kadar yapılmış, verilerine ve klinik bilgilerine ulaşılabilen miRNA mikrodizin çalışmaları, geliştirilen ANOVA temelli ve sıralama tabanlı meta-analiz yöntemi uygulanarak bir araya getirilmiş ve meme kanserinin alt tipleri için belirteç adayları miRNA'lar ortaya çıkartılmıştır (meta-miRNA). Elde edilen miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesi ve yolak analizlerinin yapılması, miRNA'ların meme kanseri oluşumu ve gelişimindeki rollerine açıklık getirmektedir. Ayrıca geliştirilen meta-analiz yöntemi meme kanserinde yapılmış olan ifade mikrodizin verilerine de uygulanmış ve yine meme kanseri alt tiplerinde ifade farklılıkları gösteren transkriptler (genler) ortaya çıkartılmıştır (meta-gen). Meta-miRNA'ların hedef genlerini meta-gen'ler ile kıyaslama imkanı da sağlayan bu çalışma ile meme kanserinde miRNA imzalarının bulunmasının yanı sıra miRNA-mRNA ilişkisi de açıklanmaya çalışılmıştır. Meta-miRNA'lar ve meta-mRNA'lar için doğrulama çalışmaları meme dokularında eş-zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Meta-analiz sonucu ortaya çıkan ve hepsi let-7 ailesine ait miRNA'ların, bağımsız tümörler ile yapılan eş-zamanlı PZR çalışması ile meme kanseri tümör dereceleri için belirteç adayları olduğu onaylanmıştır. Ayrıca meta-miRNA'ların hedeflerinin meta-analiz sonucu elde edilen meta-mRNA listeleri ile büyük ölçüde ortaklık gösterdiği bulunmuştur. Yolak analizleri sonucunda ortak hedeflerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre döngüsü, MAPK, Jak-STAT ve TGF-beta sinyal yolları gibi kanserde önemi bilinen yollarla rol aldığı gösterilmiştir. Hedef genler ile gerçekleştirilen eş-zamanlı PZR sonuçları ve biyoinformatik analizler de meta-analiz sonuçlarını doğrular niteliktedir.

2013, 142 sayfa

Anahtar kelimeler: mikroRNA (miRNA), meme kanseri, meta-analiz, miRNA mikrodizin analizi, mikrodizin

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

The Classification of Histologic and Pathologic Subtypes of Breast Cancer with Meta-Analysis Based miRNA Signatures

Yasemin Oztemur

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assist. Prof. Bala Gur Dedeoglu

MicroRNAs (miRNAs) are small RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally. MicroRNAs play a key role in diverse biological processes, including development, cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Accordingly, altered miRNA expression is likely to contribute to human disease, cancer formation and also progression. Intensifying research in miRNA studies, using a range of techniques including miRNA cloning, quantitative PCR and microarrays has resulted in the identification and confirmation of abnormal miRNA expression in a number of human malignancies including breast cancer

This is the first meta-analysis study that combines miRNA microarray studies conducted in breast cancer. In this study, the breast cancer miRNA microarray studies were collected according to the availability of their raw data and combined by an ANOVA dependent ranking-based meta-analysis to find out candidate miRNA biomarkers (meta-miRNAs) that classify breast cancer into subtypes. The targets of meta-miRNAs were found and pathway analysis was performed with these target genes, which explained the roles of miRNAs in the development and progression of breast cancer. Furthermore the same meta-analysis approach was applied to the mRNA microarray studies in breast cancer and meta-genes that could classify breast cancer tumors into subtypes were demonstrated. With this study in addition to the identification of miRNA signatures the relation between miRNAs and mRNAs was also explained. The validation studies both for meta-miRNAs and meta-mRNAs were performed by qRT-PCR analysis.

The qRT-PCR studies performed with independent breast tumors confirmed the potential biomarker role of let-7 family members in grade classification in breast cancer. Additionally the targets of meta-miRNAs were found to be highly correlated with the meta-mRNAs. The pathway analysis results showed that most of the common genes between miRNA targets and mRNAs were taking part in cancer related pathways like cell cycle, MAPK, Jak-STAT and TGF-beta. The qRT-PCR studies together with bioinformatic analyses confirmed the results of meta-analysis study.

2013, 142 pages

Keywords: microRNA (miRNA), breast cancer, meta-analysis, miRNA microarrays, microarray

TEŞEKKÜR

Çok sevgili danışmanım, canım hocam Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na, muhteşem öğretmenliği, kelimenin tam anlamıyla sonsuz sabrı, paha biçilemez dostluğu, yapabileceğime dair sınırsız inancı ve geçtiği her yeri olduğu gibi hayatımı, yolumu aydınlattığı için,

Değerli hocam Doç. Dr. F. Duygu Özel Demiralp'e, bu yola girmemde en büyük paya sahip olduğu ve bana hep güvendiği için,

Hayatta tanıdığım en iyi kalpli, en idealist insanlardan biri olan hocam Tufan Bekmez'e, çalışmamın en zor aşamasındaki büyük yardımları ve hep gülen yüzü için,

Elinde büyüdüğüm teyzem ve sevgili hocam Prof. Dr. Nuran Diril'e meslek seçimimdeki büyük katkısı ve her zaman hissettirdiği sevgisi için,

Canım grup arkadaşım Alp Aydos'a, çalışmalarım ve özel hayatımda her an desteğini yanı başımda hissettiğim ve mükemmel yol arkadaşlığı için,

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna tez çalışmamı 112T679 numaralı proje kapsamında desteklediği için,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Ailesine, özellikle Funda Kaya Demirsoy'a ve BGD Lab üyelerine, her gün büyük bir mutlulukla kapıdan girmemi sağladıkları, güzel yürekleri ve bitmeyen enerjileri için,

Başta Selen Peker olmak üzere, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proteobilim Grubunun sevgili üyelerine, yolun daha en başında bana sevgiyle kucak açtıkları için,

Değerli hocamın kıymetli hocası Doç. Dr. Işık Yuluğ ve ekibine, örnek teminindeki büyük destekleri için,

Miniğimiz Bade Dedeoğlu'na, gelişiyse bütün güzellikleri getirdiği için, uğuru için,

Sevgili dostlarıma, her elimi uzattığımda orada oldukları, iyi günler gibi kötü günleri de paylaştığımız için ve özellikle Deniz Atıla'ya varlığı için,

Kardeşliğin kan bağına ihtiyaç duymadığının kanıtı kız kardeşim Ekin Varlı'ya, bu eşsiz dostluğu bana yaşattığı için,

Annem Şaziye, babam Yaşar, abim Mert, ablam Aslı Öztemur'a ve teyzem Aliye Kovulmaz'a hayatta sahip olduğum her şey için, destekleri, sevgileri, güvenleri, bugün güçlü ve mutlu bir insansam tek sebebi oldukları için,

Sonsuz Teşekkürler...

Yasemin Öztemur

Aralık, 2013

Annem Şaziye ve Babam Yaşar ÖZTEMUR'a

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	2
2.1. MEME KANSERİ	2
2.1.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI	3
2.1.1.1. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırması	4
2.1.1.2. Meme Kanserinin Patolojik Sınıflandırması	5
2.1.1.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması	6
2.2. MİKRORNA	9
2.2.1. MİKRORNA’LARIN KEŞFİ	9
2.2.2. MİKRORNA BİYOGENEZİ	11
2.2.3. MİKRORNA’LARIN ETKİ MEKANİZMASI	13
2.2.4. MİKRORNA’LARIN ADLANDIRILMASI VE MİRBASE VERİTABANI	14
2.3. MİKRORNA VE MEME KANSERİ	16

2.4. Mikrodizin Yöntemi	18
2.4.1. Mikrodizin Tanımı ve Temeli	18
2.4.2. Mikrodizin Teknolojisinin Kullanım Alanları	18
2.4.3. Mikrodizin Platformları	19
2.4.4. Mikrodizin Veritabanları	19
2.5. Meta-Analiz	21
<u>3. Gerekçe ve Amaç</u>	<u>26</u>
<u>4. Materyal ve Yöntem</u>	<u>28</u>
4.1. Materyal	28
4.1.1. Meme Kanseri miRNA Mikrodizin Çalışmaları	28
4.1.2. Meme Kanseri mRNA Mikrodizin Çalışmaları	29
4.1.3. Doku Örnekleri	30
4.1.4. Kitler	31
4.1.5. Primerler	32
4.2. Yöntem.....	34
4.2.1. Literatür Araştırması	34
4.2.2. Verilerin İndirilmesi ve Düzenlenmesi.....	35
4.2.3. Klinik Bilgilerin İndirilmesi ve Düzenlenmesi	37
4.2.4. Meta-Analiz Programının Geliştirilmesi.....	39
4.2.5. Geliştirilen Meta-Analiz Yönteminin Seçilen miRNA Çalışmalarına Uygulanması.....	43
4.2.6. Belirteç Adayı miRNA'ların (Meta-miRNA) Hedef Genlerinin Bulunması ve miRNA Hedef Genlerine Yolak Analizlerinin Uygulanması.....	44
4.2.7. Geliştirilen Meta-Analiz Yönteminin Bağımsız mRNA Çalışmalarına Uygulanması.....	46
4.2.8. miRNA Hedef Gen Listelerinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listeleri ile Karşılaştırılması.....	46
4.2.9. Ortak Gen Listelerine Yolak Analizlerinin Uygulanması	47

4.2.10. BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN İFADE FARKLILIĞININ TÜRÖR MEME DOKUSU ÖRNEKLERİNDE EŞ-ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI.....	47
4.2.11. SEÇİLEN mRNA'LARIN İFADE FARKLILIĞININ TÜRÖR MEME DOKUSU ÖRNEKLERİNDE EŞ-ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI.....	48
4.2.12. SEÇİLEN META-MRNA'LARIN BIYOİNFORMATİK OLARAK ONAYLANMASI.....	49
4.2.13. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	49
4.2.13.1. ANOVA Testi.....	49
4.2.13.2. t-Testi.....	49
4.2.13.3. Kümeleme Analizi (Cluster Analysis).....	49
4.2.13.4. Ayırma Analizi (Discriminant Function Analysis)	50
4.2.13.5. Mann Whitney Testi	50

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 51

5.1. META-ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN BELİRTEÇ ADAYI META-miRNA LİSTELERİ 51

5.1.1. ER STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI META-miRNA LİSTESİ.....	51
5.1.2. TÜRÖR DERECESİ (GRADE) İÇİN BELİRTEÇ ADAYI META-miRNA LİSTESİ.....	52
5.1.3. HER2 STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI META-miRNA LİSTESİ.....	52
5.1.4. MOLEKÜLER ALT TIP İÇİN BELİRTEÇ ADAYI META-miRNA LİSTESİ.....	53
5.1.5. PR STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI META-miRNA LİSTESİ.....	53

5.2. BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN HEDEF GENLERİNİN BULUNMASI VE ORTAK GENLERİN YOLAK ANALİZİ SONUÇLARI 54

5.2.1. ER STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN HEDEF GENLERİNİN BULUNMASI VE ORTAK GENLERİN YOLAK ANALİZİ SONUÇLARI	55
5.2.2. TÜRÖR DERECESİ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN HEDEF GENLERİNİN BULUNMASI VE ORTAK GENLERİN YOLAK ANALİZİ SONUÇLARI	56
5.2.3. HER2 STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN HEDEF GENLERİNİN BULUNMASI VE ORTAK GENLERİN YOLAK ANALİZİ SONUÇLARI	60
5.2.4. MOLEKÜLER ALT TIP İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN HEDEF GENLERİNİN BULUNMASI VE BU GENLERİN YOLAK ANALİZİ SONUÇLARI.....	62
5.2.5. PR STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN HEDEF GENLERİNİN BULUNMASI VE ORTAK GENLERİN YOLAK ANALİZİ SONUÇLARI	66

5.3. META-ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN ÖRNEK MRNA LİSTELERİ	68
5.3.1. ER STATÜSÜ İÇİN META-ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN ÖRNEK MRNA LİSTESİ....	68
5.3.2. TÜRÖR DERECEİ İÇİN META-ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN ÖRNEK MRNA LİSTESİ	69
5.3.3. HER2 STATÜSÜ İÇİN META-ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN ÖRNEK MRNA LİSTESİ	69
5.3.4. PR STATÜSÜ İÇİN META-ANALİZ SONUCU ELDE EDİLEN ÖRNEK MRNA LİSTESİ....	70
5.4. miRNA HEDEF GEN LİSTELERİNİN META-ANALİZ YÖNTEMİNİN UYGULANDIĞI MRNA ÇALIŞMALARINDAN ÇIKAN GEN LİSTELERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI	70
5.4.1. ER STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA HEDEF LİSTESİNİN META-ANALİZ YÖNTEMİNİN UYGULANDIĞI MRNA ÇALIŞMALARINDAN ÇIKAN GEN LİSTESİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI	71
5.4.2. TÜRÖR DERECEİ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA HEDEF LİSTESİNİN META-ANALİZ YÖNTEMİNİN UYGULANDIĞI MRNA ÇALIŞMALARINDAN ÇIKAN GEN LİSTESİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI	74
5.4.3. HER2 STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA HEDEF LİSTESİNİN META-ANALİZ YÖNTEMİNİN UYGULANDIĞI MRNA ÇALIŞMALARINDAN ÇIKAN GEN LİSTESİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI	76
5.4.4. PR STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA HEDEF LİSTESİNİN META-ANALİZ YÖNTEMİNİN UYGULANDIĞI MRNA ÇALIŞMALARINDAN ÇIKAN GEN LİSTESİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI	79
5.5. BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI	83
5.5.1. ER STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI	84
5.5.2. HER2 STATÜSÜ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI	84
5.5.3. TÜRÖR DERECEİ İÇİN BELİRTEÇ ADAYI miRNA'LARIN EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI.....	85
5.6. SEÇİLEN MRNA'LARIN EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI.....	89
5.7. SEÇİLEN MRNA'LARIN BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI	92
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	95
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>102</u>

<u>EKLER</u>	<u>112</u>
<u>EK1: META-ANALİZ KODU</u>	<u>112</u>
<u>EK2: TEMSİLİ MİRNA EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI</u>	<u>117</u>
<u>EK3: TEMSİLİ MRNA EŞ-ZAMANLI PZR SONUÇLARI</u>	<u>118</u>
<u>EK4: ETİK KURUL FORMU.....</u>	<u>119</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>121</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Memenin anatomisi.	2
Şekil 2.2. Amerikan Kanser Derneği'nin yayımladığı yeni kanser vakaları ve kanser ölümleri 2013 tahmin yüzdeleri.	3
Şekil 2.3. Meme kanserinin sınıflandırılması ile ilgili tablo.	4
Şekil 2.4. Gen ifade farklılıklarına bakılarak meme kanserinin moleküler olarak sınıflandırılmasına ait heatmap görüntüsü.	7
Şekil 2.5. Gen ifade farklılıklarına bakılarak meme kanserinin moleküler olarak sınıflandırılmasına ait claudin low alt tipini de içeren heatmap görüntüsü.	8
Şekil 2.6. lin-4 miRNA' sının <i>lin-14</i> geninin 3' UTR bölgesine bağlanarak translasyonunu baskılamasını gösteren şekil.	10
Şekil 2.7. miRNA biyogenezinin basamaklarını gösteren şekil.	12
Şekil 2.8. miRNA'nın hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanması.	14
Şekil 2.9. miRBASE veritabanında insan pre-miRNA'sı hsa-mir-1-1'e ait ekran görüntüsü.	15
Şekil 2.10. GEO veritabanının ana sayfasına ait ekran görüntüsü.	20
Şekil 2.11. ArrayExpress veritabanının ana sayfasına ait ekran görüntüsü.	21
Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması.	34
Şekil 4.2. GEO veri tabanında GSE15885 erişim numaralı çalışma için işlenmiş verinin indirildiği sekmeyi gösteren ekran görüntüsü.	36
Şekil 4.3. ArrayExpress veri tabanında E-MTAB-1006 erişim numaralı çalışma için işlenmiş verinin indirildiği sekmeyi gösteren ekran görüntüsü.	36
Şekil 4.4. GSE15885 erişim numaralı çalışmaya ait veri dosyasının meta-analiz programında kullanılmak üzere düzenlenmiş şeklini gösteren ekran görüntüsü.	37

Şekil 4.5. GSE15885 erişim numaralı çalışmaya ait klinik bilgi dosyasını gösteren ekran görüntüsü. _____	38
Şekil 4.6. GSE15885 erişim numaralı çalışmaya ait klinik bilgi dosyasının meta-analiz programında kullanılmak üzere düzenlenmiş şeklini gösteren ekran görüntüsü. _____	38
Şekil 4.7. hsa-let-7c'nin GSE15885 erişim numaralı çalışmadaki sıralamasını gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü. _____	40
Şekil 4.8. hsa-let-7c'nin GSE22216 erişim numaralı çalışmadaki sıralamasını gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü. _____	40
Şekil 4.9. hsa-let-7c'nin GSE7842 erişim numaralı çalışmadaki sıralamasını gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü. _____	41
Şekil 4.10. En küçük sıralama ortalamasının sonuç sıralama değerine göre ilk sırada olduğunu gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü. _____	42
Şekil 4.11. Meta-analiz yönteminin iş akış şeması. _____	43
Şekil 4.12. miRWalk sitesinden deneysel olarak onaylanmış miRNA hedeflerinin alınmasını gösteren ekran görüntüsü. _____	44
Şekil 4.13. miRWalk sitesinde ER belirteç adayları olan hsa-miR-30a-3p (hsa-miR-30a*) için deneysel olarak onaylanmış hedef listesini gösteren ekran görüntüsü. _____	45
Şekil 5.1. Bazı belirteç adayları miRNA'lar (ER,HER2 ve PR için sıralamada ilk 3 miRNA) için düzenlenmiş örnek hedef gen listesine ait ekran görüntüsü. _____	54
Şekil 5.2. ER patolojik alt tipi için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın ortak hedef gen sayısını gösteren Venny aracı ile çizilmiş venn şeması. _____	55
Şekil 5.3. ER için ilk 3 miRNA'nın ortak hedef genleri olan CDKN2A ve TP53'ün KEGG yolak analiz sonucu. _____	56
Şekil 5.4. Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın ortak hedef genlerinin 49 tanesinin KEGG yolak analiz sonucu. _____	60

- Şekil 5.5.** HER2 patolojik alt tipi için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın ortak hedef gen sayısını gösteren Venny aracı ile çizilmiş venn şeması. _____ 61
- Şekil 5.6.** HER2 için ilk 3 miRNA'nın ortak hedef genlerinden DICER1 için KEGG yolak analiz sonucu. _____ 62
- Şekil 5.7.** Moleküler alt tip için ilk 3 miRNA'nın toplam hedef genlerinin 56 tanesinin örnek KEGG yolak analiz sonucu. _____ 66
- Şekil 5.8.** PR patolojik alt tipi için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın ortak hedef gen sayısını gösteren Venny aracı ile çizilmiş venn şeması. _____ 67
- Şekil 5.9.** PR için ilk 3 miRNA'nın ortak hedef genlerinden ERBB2 için KEGG yolak analiz sonucu. _____ 67
- Şekil 5.10.** ER için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 3'ünün deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması. _____ 71
- Şekil 5.11.** ER alt tipinde sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *apoptoz* yolağındaki 4 gen için KEGG yolak analiz sonucu. _____ 73
- Şekil 5.12.** Tümör derecesi için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 6'sının deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması. _____ 74
- Şekil 5.13.** Tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *kanser yolağı*ndaki 7 gen için KEGG yolak analiz sonucu. _____ 76
- Şekil 5.14.** HER2 için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 3'ünün deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması. _____ 77

- Şekil 5.15.** HER2 için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *apoptoz* yolağındaki 4 gen için KEGG yolak analiz sonucu. _____ 79
- Şekil 5.16.** PR için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 3'ünün deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması. _____ 80
- Şekil 5.17.** PR için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *kanser yolağı*ndaki 22 gen için KEGG yolak analiz sonucu. _____ 83
- Şekil 5.18.** ER- ve ER+ tümörler arasında eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 84
- Şekil 5.19.** HER2- ve HER2+ tümörler arasında eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 85
- Şekil 5.20.** Tümör derecesi 1 (TD1) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 86
- Şekil 5.21.** GSE15885 çalışmasından elde edilen veriler ile hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a ve hsa-let-7i için çizilen heatmap. _____ 88
- Şekil 5.22.** Tümör derecesi 1 (TD1), tümör derecesi 2 (TD2) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 89
- Şekil 5.23.** Tümör derecesi 1 (TD1) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen mRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 90
- Şekil 5.24.** Tümör derecesi 1 (TD1) ve tümör derecesi 2 (TD2) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen mRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 91
- Şekil 5.25.** Tümör derecesi 2 (TD2) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen mRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiğı. _____ 92

Şekil 5.26. E-MTAB-1006 çalışmasında 49 gen üzerinden ve seçilen gruplar için (TD1, TD2 ve TD3) “Class comparison” (sınıf karşılaştırması) analizi sonucu elde edilen istatistiksel olarak anlamlı olarak farklılık gösteren 20 gen ile çizilen heatmap. _____ 93

Şekil 5.27. GSE22219 çalışmasında 49 gen üzerinden ve seçilen gruplar için (TD1, TD2 ve TD3) “Class comparison” (sınıf karşılaştırması) analizi sonucu elde edilen istatistiksel olarak anlamlı olarak farklılık gösteren 17 gen ile çizilen heatmap. _____ 94

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 2.1.** Çalışmada meta-analizde kullanılan gen ifade veri setlerini, örnek sayılarını ve platformları gösteren tablo. _____ 23
- Çizelge 2.2.** Meta-analizde kullanılan gen ifade veri setlerinin alındığı çalışmayı, yayımlandığı dergiyi, çalışmanın gerçekleştirildiği platformu, ER+ ve ER- örnek sayılarını gösteren tablo. _____ 24
- Çizelge 2.3.** GenMAPP programı ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan yolaklar. _____ 25
- Çizelge 4.1.** Meta-analiz çalışması için kullanılan meme kanseri miRNA mikrodizin çalışmalarının erişim numarası, verilerin elde edildiği kaynak ve çalışmanın gerçekleştirildiği platform bilgileri. _____ 28
- Çizelge 4.2.** Meta-analizde kullanılan miRNA çalışmalarının erişim numaraları ve alt tiplere göre belirlenmiş örnek sayıları. _____ 29
- Çizelge 4.3.** Meta-analiz çalışması için kullanılan meme kanseri mRNA mikrodizin çalışmalarının erişim numarası, verilerin elde edildiği kaynak ve çalışmanın gerçekleştirildiği platform bilgileri. _____ 29
- Çizelge 4.4.** Meta-analizde kullanılan mRNA çalışmalarının erişim numaraları ve alt tiplere göre belirlenmiş örnek sayıları. _____ 30
- Çizelge 4.5.** Eş zamanlı PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) de kullanılan meme tümör dokularının tümör kodları ve klinik bilgileri. _____ 30
- Çizelge 4.6.** Eş zamanlı PZR’de kullanılan primerlerin miRNA adı, sekans ve Qiagen ürün adı bilgileri. _____ 32
- Çizelge 4.7.** Eş zamanlı PZR’de kullanılan primerlerin gen adı, forward (ileri) ve reverse (geri) sekans, ürün boyutu bilgileri. _____ 33
- Çizelge 5.1.** ER için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar. _____ 51

Çizelge 5.2. Tümör derecesi için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayları meta-miRNA’lar.	52
Çizelge 5.3. HER2 için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayları meta-miRNA’lar.	52
Çizelge 5.4. Moleküler alt tip için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayları meta-miRNA’lar.	53
Çizelge 5.5. PR için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayları meta-miRNA’lar.	53
Çizelge 5.6. ER için ilk 3 miRNA’nın ortak hedefleri olan CDKN2A ve TP53’ün KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.	55
Çizelge 5.7. Tümör derecesi için sonuç sıralama değerine göre ilk 6 miRNA’nın ortak hedef gen listesi.	57
Çizelge 5.8. Tümör derecesi için ilk 6 miRNA’nın ortak 251 hedefi için KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.	59
Çizelge 5.9. Moleküler alt tip için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA’nın toplam hedef gen listesi.	63
Çizelge 5.10. Moleküler alt tip için ilk 3 miRNA’nın toplam hedefleri için KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.	65
Çizelge 5.11. ER için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.	68
Çizelge 5.12. Tümör derecesi için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.	69
Çizelge 5.13. HER2 için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.	69
Çizelge 5.14. PR için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.	70

- Çizelge 5.15.** ER için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları. _____ 71
- Çizelge 5.16.** ER alt tipinde sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları için KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu. _____ 72
- Çizelge 5.17.** Tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları. _____ 74
- Çizelge 5.18.** Tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarının KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu. _____ 75
- Çizelge 5.19.** HER2 için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları. _____ 77
- Çizelge 5.20.** HER2 için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarının KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu. _____ 78
- Çizelge 5.21.** PR için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları. _____ 80
- Çizelge 5.22.** PR için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarının KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu. _____ 82
- Çizelge 5.23.** hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a ve hsa-let-7i için ayırma analizi (Discriminant Function Analysis) sonucu elde edilen tablo. _____ 87

SİMGELER DİZİNİ

miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
ER	Östrojen reseptörü
PR	Progesteron reseptörü
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
TD	Tümör Derecesi
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1. GİRİŞ

mikroRNA'ların hücredeki önemli mekanizmaları regüle ettiği bulunmuş ve bazı kanser türlerinde önemli düzenleyici roller aldıkları gösterilmiştir. Yüksek işlem kapasiteli bir metot olan mikrodizin analizinin miRNA çalışmaları için kullanılmaya başlanması çeşitli kanser tiplerinde miRNA ifade profillerinin elde edilmesine olanak sağlamıştır. Meme kanserinde de miRNA ifade profillerinin çıkartılmasına yönelik mikrodizin çalışmaları yapılmış ve kanserli dokuyu normal dokudan ayırabilen ya da ER, PR ve HER2 gibi hormon reseptörlerinin ifadeleriyle ilişkilendirilmiş mikroRNA'ların varlığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada şimdiye kadar yapılan, verilerine ve klinik bilgilerine ulaşılabilen meme kanseri miRNA mikrodizin çalışmaları istatistiksel ve biyoinformatik teknikler kullanılarak bir araya getirilmiş (meta-analiz) ve meme kanseri alt tiplerini ayırıcı biyobelirteç adayı miRNA'lar ortaya çıkartılmıştır.

Meta-analiz, çeşitli mikrodizin çalışmalarının bir araya getirilmesi amacıyla kullanılan bir yöntem olsa da şimdiye kadar meme kanseri ile ilgili mikroRNA mikrodizin çalışmalarını kapsayan bir meta-analiz çalışması hiç yapılmamıştır. Meme kanseri oluşumu ve gelişiminde etkili olan miRNA'ları bulmayı hedefleyen bu çalışma birçok miRNA mikrodizin verisini bir araya getirerek yapılan ilk miRNA meta-analiz çalışması olmuştur. Bu yöntem meme kanserinde farklı olarak ifade edilen ancak bağımsız çalışmalarca şimdiye kadar gösterilememiş özgün miRNA'ların bulunmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca geliştirilen meta-analiz programı gibi bir yazılımın şimdiye kadar literatürde yer almamış olması ve bir metodoloji yayını ortaya çıkarma potansiyelinin bulunması çalışmaya özgün değer katmaktadır.

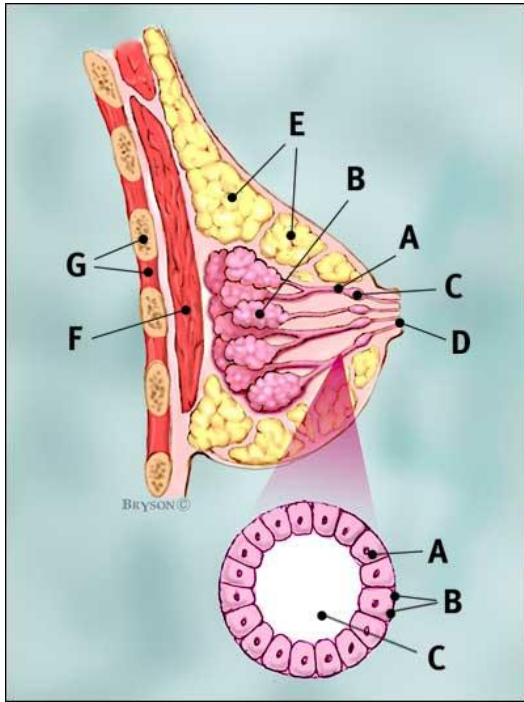
Çalışma süresince literatürden toplanan pek çok veri bir araya getirildiği için, elde edilen sonuçlar yalnızca bir vakaya özel değildir ve genel bir bakış açısını yansıtmaktadır. Çıkan miRNA hedef genlerinin farklı ifade mikrodizin çalışmaları ile karşılaştırılması, miRNA-mRNA ilişkisinin kurulmasını sağlamakta, çıkan sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini güçlendirmektedir. mikroRNA-meme kanseri ilişkisini detaylı bir şekilde tanımlayabilmek, meme kanseri tanı ve tedavisi için alternatif ve belki de daha etkin hedeflerin belirlenmesine de katkıda bulunacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri ile ilgili ilk yazılı bilgi dünyanın en eski cerrahi dokümanı olarak bilinen ve M.Ö. 3000-2500 yıllarına ait Edwin Smith Papirüslerinde yer almaktadır. Antik Mısır'a ait bu metinde hastalığın başarılı tedavisinin mümkün olmadığı bildirilmiştir (1). Bugün ise meme kanseri kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve akciğer kanserinden sonra kadınlarda kanser ölümlerinde ikinci sıradadır (2, 3).

Normal meme dokusu lobül (süt üreten doku) denilen yapıların bir araya gelmesiyle oluşan lob (süt bezi), meme başına süt taşıyan duktus (süt kanalları) ve yağ dokusundan oluşmaktadır. Duktus ve lobüller çevre dokulardan bazal membran ile ayrılmaktadır.



• Meme Kesiti

- A. Süt Kanalı
- B. Lobüller (Süt Bezleri)
- C. Kanalın Süt Tutan Geniş Kısmı
- D. Meme Ucu
- E. Yağ
- F. Pektoralis Kası
- G. Göğüs Kemiği / Göğüs Duvarı

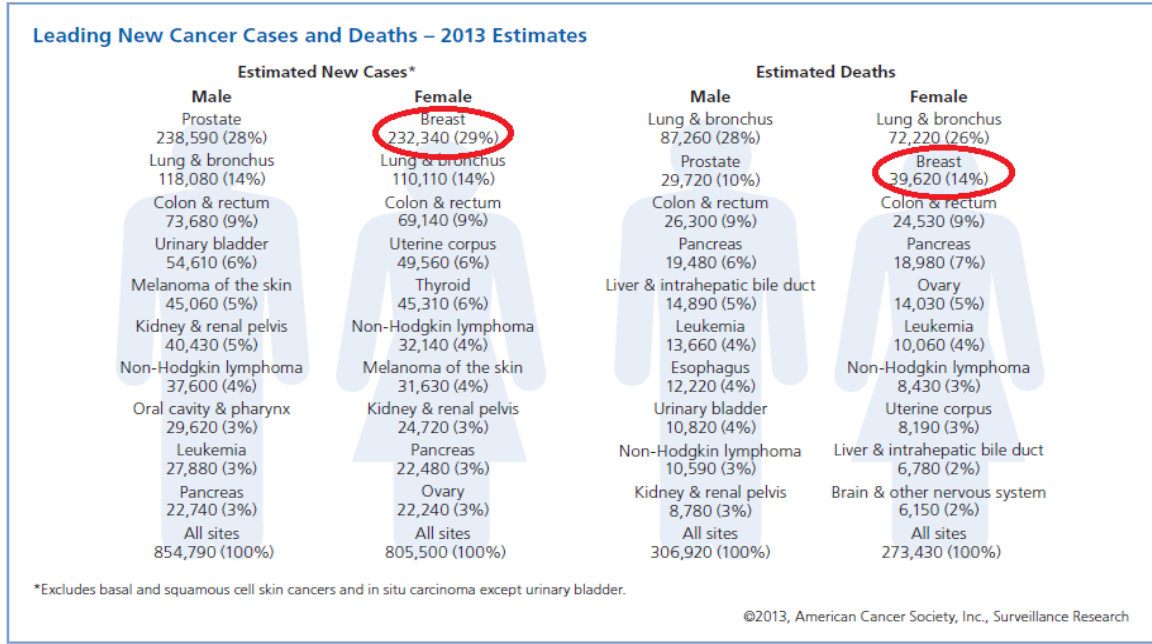
• Kanal Kesiti

- A. Normal Kanal Hücresi
- B. Bazal Membran
- C. Lümen (Kanal Merkezi)

Şekil 2.1. Memenin anatomisi (4).

Amerikan Kanser Derneği'nin son istatistiklerine göre her 8 kadından 1 tanesinde invaziv meme kanseri gelişmektedir ve 2013 tahminlerine göre;

- Yaklaşık 232,340 yeni kadın hastaya invaziv meme kanseri teşhisi konulacak.
- Yaklaşık 64,640 yeni vaka karsinoma in situ (meme kanserinin erken ve yayılmamış tipidir) teşhisi alacak.
- Yaklaşık 39,620 kadın ise meme kanseri sebebi ile ölecek.



Şekil 2.2. Amerikan Kanser Derneği'nin yayımladığı yeni kanser vakaları ve kanser ölümleri 2013 tahmin yüzdeleri (2).

Erken teşhis ve gelişmekte olan tedavi yöntemleri ile meme kanseri sebepli ölüm oranları yıllar geçtikçe düşmektedir. Bu düşüş, büyük ihtimalle mamografik taramaların artması, daha iyi cerrahi ve radyoterapi gibi birçok faktörün etkisi sonucunda ortaya çıkmaktadır.

Meme kanseri gelişiminde birçok risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar; etnik köken, cinsiyet, yaş, aile hikayesi, hormonal faktörler (ör: menopoz sonrası hormon tedavisi), regl başlama yaşının erken, menopoz yaşının geç olması, hiç doğum yapılmaması veya ilk doğumun geç yaşta yapılması, beslenme ve çevresel faktörlerdir (1, 5).

2.1.1. Meme Kanserinin Sınıflandırması

Meme kanseri kompleks ve tek sebebe bağlı olmayan genetik bir hastalıktır (6). Kalıtsal, ailesel ve sporadik olarak 3 grupta incelenmektedir. Ailede bir veya daha fazla kişide meme kanseri görülmesi halinde buna ailesel meme kanseri denilmektedir. Meme kanseri ile birebir ilişkisi tespit edilmiş olan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon olması, ailedeki kanserlerin erken yaşta görülmesi, ailede erkeklerde de meme kanseri görülmesi hastalığın kalıtsal olduğunu işaret etmektedir. Kalıtsal meme kanseri durumundaki kişilerin yaşamları boyunca meme kanserine yakalanma riskleri %85 gibi çok yüksek oranlarda bulunmuştur. Bu iki grubun dışında kalanlar ise ailesel ve kalıtsal bir bağlantısı olmayan sporadik (tesadüfi/rastlantısal) meme kanserleridir (2).

Meme kanserine sebep olan ve gelişiminde rol oynayan pek çok gen (BRCA1 ve BRCA2 gibi) tespit edilmiş olsa da regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar hala tam olarak açıklanamamıştır. Bu eksiklik, meme kanseri oluşumunu öngörücü yeni biyobelirteçlerin aranmasını zorunlu kılmaktadır.

Yüksek işlem hacimli mikrodizin tabanlı ifade profili teknolojilerinin gelişmesi meme kanserinde büyük ölçekli çalışmaları kolaylaştırmış ve meme kanserinin nedenlerini ve oluşumunu aydınlatacak pek çok veri elde edilmiş ve yeni biyobelirteçler ile özgün ve tedaviye yönelik hedefler belirlenebilmiştir (6).

Meme tümörleri; morfolojik, klinik, hormon reseptör düzeyi, tedaviye yanıtlarına göre farklı özellikleri olan, heterojen tümörlerdir. Bu farklılığın sebebi, altta yatan hedef hücre (kanser hücresi) sayısındaki farklılık, farklı onkogen aktivasyonu ve/veya tümör baskılayıcı gen fonksiyon kayıplarındaki değişik kombinasyonlardır (7). Bu nedenle histolojik ve patolojik sınıflandırmanın yanında ifade mikrodizin çalışmaları sayesinde meme kanseri moleküler olarak da sınıflandırılmıştır ve bu sınıflandırmanın daha kuvvetli olduğu açıktır (8, 9).



Şekil 2.3. Meme kanserinin sınıflandırılması ile ilgili tablo.

2.1.1.1. Meme Kanserinin Histolojik Sınıflandırması

Meme kanserinin histolojik sınıflandırması temel olarak kanserin hangi yapıdan geliştiğine ve yayılma tipine göre olmaktadır. Duktuslardan yani süt kanallarından ya da lobüllerden yani süt bezlerinden gelişmesine göre iki tiptir. Yapının dışına yayılmasıyla invaziv, yapının içerisinde kalmasıyla in situ olarak adlandırılır. Bunlar;

Duktal Meme Kanseri: Süt kanallarından gelişir, en fazla görülen kanser tipidir.

- **Duktal Karsinoma in situ (DCIS):** Meme kanserinin en erken ve in situ tiplerinin en fazla görülen formudur, anormal hücreler meme dokusuna yayılmamıştır. Ancak yapılan çalışmalar tedavi uygulanmadığı takdirde DCIS'nin 1/3 oranda invaziv kansere dönüştüğünü göstermektedir.
- **İnvaziv Duktal Karsinom (IDC):** Kanser önce kanal içinde başlar sonra kanal duvarını aşar ve meme dokusuna bazen de meme dışına yayılım gösterir. İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturur.

Lobüler Meme Kanseri: Süt bezlerinden gelişir ve daha seyrek görülür.

- **Lobüler Karsinoma in situ (LCIS):** Lobüllerde anormal hücrelerin bulunmasıdır ve yüksek meme kanseri riskini gösterir.
- **İnvaziv lobüler Kanser (ILC):** Kanser hücrelerinin lobüllerin dışına geçtiği formudur. Hücreler meme içi veya meme dışına yayılmıştır (10, 2).

2.1.1.2. Meme Kanserinin Patolojik Sınıflandırması

Meme kanserinin patolojik sınıflandırması temel olarak bazı reseptörlerin fazlalığına ve azlığına göre yapılır. Östrojen, progesteron ve HER2 reseptörlerinde fazlalık varsa pozitif, tersi durumda negatif olarak adlandırılır. Üç reseptör tipini de buldurmeyen halde ise 3'lü negatif olarak isimlendirilir. Bu şekilde patolojik olarak; ER+, ER-, PR+, PR-, HER2+, HER2- ve 3'lü negatif olmak üzere 7 çeşittir.

HER2'nin aşırı ifade edilmesi meme kanseri hastalarının %20-%30'unda görülmektedir. Tümörü HER2 ifadesi gösteren hastaların hayatta kalma ve hastalığın tekrarlama süreleri kısadır. Ayrıca HER2 ifadesi artan tümörlerin meme kanserinde sıklıkla kullanılan bir ilaç olan Tamoxifen'e ve standart kemoterapiye direnç gösterdiği bilinmektedir (11, 12). Trastuzumab (Herceptin) HER2 reseptörlerin hücre-dışı kısmını hedefleyerek fonksiyonunu bloke etmek için tasarlanmış bir ilaçtır ve HER2+ hastalarda kullanılmaktadır. Bu tedaviyi alan hastaların ömür uzunluğunun arttığı ve hastaların %26-31'lik bir kısmının ilaca cevap verdiği gösterilmiştir (13, 14).

Meme kanserlerinin yaklaşık %75'i östrojen pozitifdir (ER+) ve östrojen hormonuna yanıt olarak gelişim gösterirler. ER+ meme kanserlerinde uygulanan 5 yıllık Tamoxifen tedavisi

kanserin 10 yıl içerisinde tekrarlama ihtimalini %39 oranda azaltırken, ortalama yaşam süresini 15 yıla kadar uzatabilmektedir (15, 2).

Reseptör ifade varlığına göre yapılan patolojik sınıflandırmalar, meme kanseri hastalarının tedavi sürecine karar verilmesi ve genel olarak reseptörler hedef alınarak geliştirilen ilaçların (Trastuzumab ve Tamoxifen gibi) doğru kullanılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Meme Kanserinde Tümör Derecesi

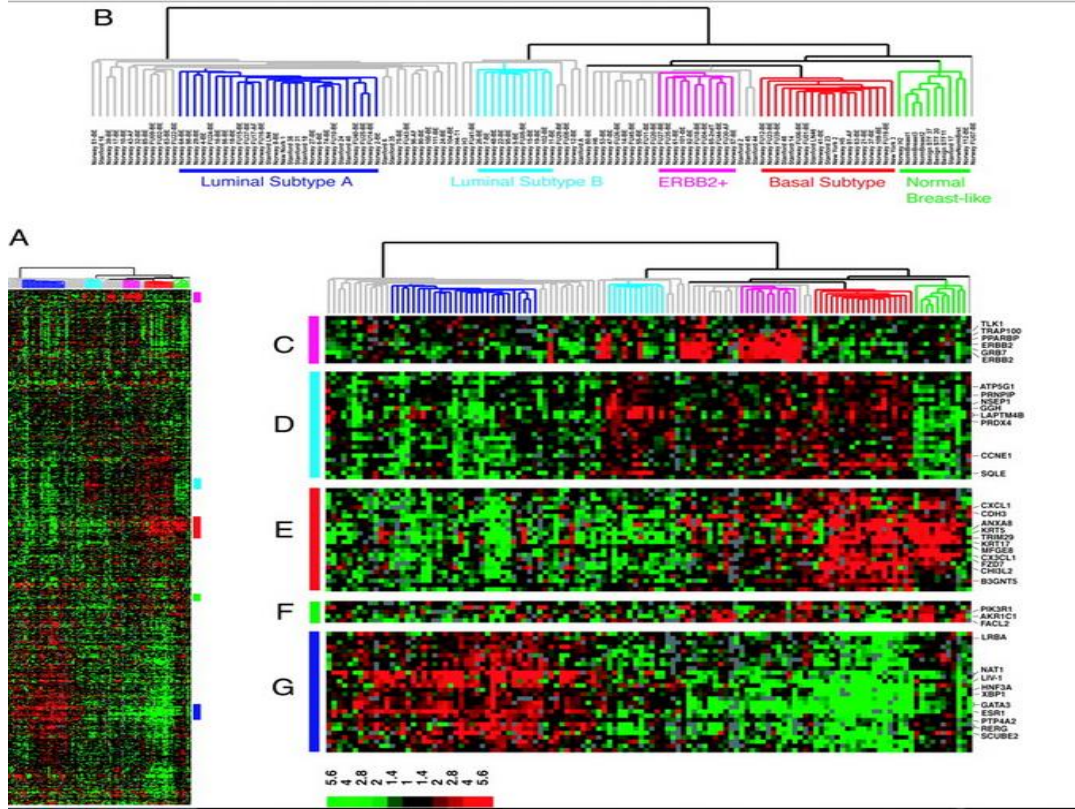
Meme kanserinin tümör derecesine göre sınıflandırılması, kanser hücrelerinin normal meme hücrelerine histolojik olarak benzerliğine dayanır. Kanser hücreleri bu açıdan tümör derecesi 1, tümör derecesi 2 ve tümör derecesi 3 olarak gruplanabilir. Bu sınıflandırmada derece ne kadar yüksekse, hücreler normalden o kadar farklıdır ve yayılma eğilimleri yüksektir (3).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar gen ifade profilleri ile tanımlanan tümör derecesi ölçüsünün (Genomic grade index, GGI) histolojik tümör derecesine oranla klinikte daha açıklayıcı olduğunu göstermektedir. Bu sınıflandırma ile tümörler, tümör derecesi ile ilişkili genlerin ifade profillerine göre belirlenerek düşük ve yüksek derece olarak isimlendirilen iki gruba ayrılmaktadır (16).

2.1.1.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırması

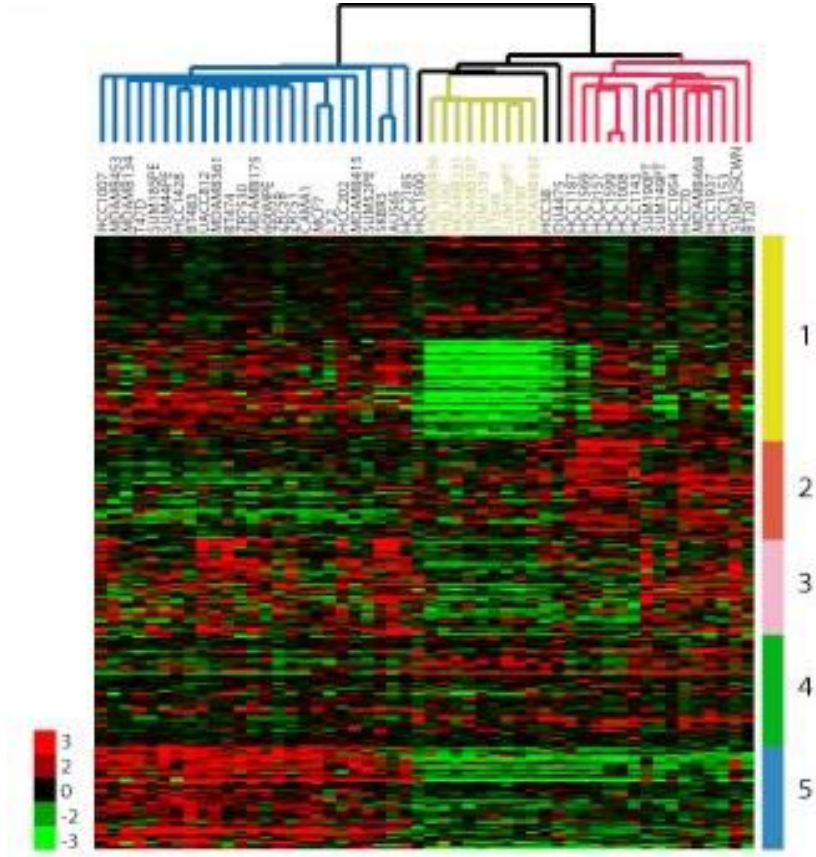
Meme kanserinin kompleks bir hastalık olması ve meme tümörlerinin farklı özelliklere sahip heterojen tümörler olması, hastalığın regülasyonundaki mekanizmaların açıklanmasını ve bunun sonucunda da tedaviyi zorlaştırmaktadır (6, 7). Bu eksiklik yeni biyobelirteçlerin aranmasını zorunlu kılmıştır ve ifade mikrodizin çalışmaları sayesinde, histolojik ve patolojik sınıflandırmanın yanında meme kanseri moleküler olarak da sınıflandırılmıştır (8, 9).

Meme kanseri, Perou ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan kapsamlı ve çığır açan gen ifade analizi çalışmasıyla önce luminal hücre benzeri, bazal hücre benzeri, normal epitel benzeri ve HER2+ grup olarak 4'e ayrılmıştır (8). Daha sonra ise luminal tipin de kendi arasında luminal A ve luminal B olarak gruplanması ile 5 alt tipe ayrılmıştır (9).



Şekil 2.4. Gen ifade farklılıklarına bakılarak meme kanserinin moleküler olarak sınıflandırılmasına ait heatmap görüntüsü (9).

Son olarak 2007 yılında yapılan çalışma ile bu alt tiplere sıkı bağlantı proteinleri claudin 3, 4 ve 7 ve bir Ca bağımlı hücre-hücre adezyon glikoproteini olan E-cadherin'in düşük gen ifadeleri ile karakterize claudin low eklenmiştir. Böylece moleküler olarak meme kanseri 6 alt tipe ayrılmıştır (17).



Şekil 2.5. Gen ifade farklılıklarına bakılarak meme kanserinin moleküler olarak sınıflandırılmasına ait claudin low alt tipini de içeren heatmap görüntüsü. 1:claudin low, 2: bazal hücre benzeri, 3: HER2+, 4: normal epitel benzeri, 5: luminal alt tipleri temsil etmektedir (18).

- Luminal A tüm meme kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır ve moleküler alt tipler arasında en sık görülen meme kanseri tipidir (19).
- Luminal A, Luminal B alt tipi ile birlikte luminal epitel hücrelere benzer bir gen ifade profilleri olduğu için bu ismi almışlardır. Bu alt tipte TP53 geni mutasyonu negatif ve östrojen reseptör pozitifdir (20, 21). Toplam yaşam süresi bu hastalarda daha uzundur (20).
- BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında Luminal A tip kanser gelişir (9).
- Luminal B alt tipi, Luminal A tipe benzemekle birlikte hastalık seyri olarak orta grupta sınıflandırılmaktadır.
- Normal meme bezlerinin bazal epitel hücrelerine benzer bir gen ifade profilleri olduğu için bu adı almışlardır. TP53 geni mutasyonları görülür ve östrojen reseptör negatiftir (20, 21).

- HER2+ grup, ERBB2 (HER2/NEU) geninin aşırı ifadesi ile karakterizedir. Hastalık seyri kötüdür. Yaşam süreleri daha kısadır ve metastazları yaygındır (9).
- Bazal hücre benzeri grubun heterojen olduğu ve alt gruplara bölünebileceği düşünülmektedir (22, 23).
- Bazal hücre benzeri grubun ER, PR ve HER2 statüsü negatiftir ve genelde BRCA1 mutasyonu görülür (9).
- Claudin low alt tipi de bazal hücre benzeri grup gibi üçlü negatiftir ve standart kemoterapiye basal hücre benzeri tipten sonra en az yanıt veren gruptur (18).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların bulunması ve hücrede çok önemli işlevlere sahip olduklarının gösterilmesi bu molekülleri de meme kanseri oluşumunda ve gelişiminde rol alan şüpheliler listesine koymuştur ve mRNA ifade profilleri ile açıklanamayan farklılıklar miRNA çipleri ile araştırılmaya başlanmıştır. miRNA çipleri sayesinde meme kanserine sebep olabilecek hedef miRNA'lar bulunmaya başlanmıştır ancak bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (24).

İfade (gen ve miRNA) çalışmalarının artması, bu sayede meme kanserinin moleküler alt gruplarını daha detaylı tanımlayacak standart yöntemlerin geliştirilmesi, moleküler tiplerin yeni alt gruplarının ortaya çıkması ve bu grupların tedaviyi yönlendirmesi beklenen gelişmelerdir.

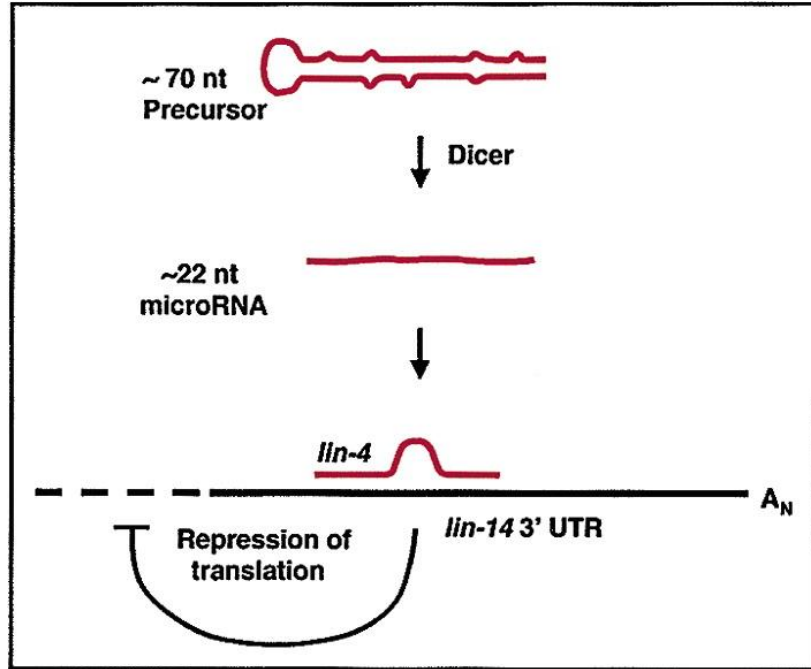
2.2. MikroRNA

2.2.1. MikroRNA'ların Keşfi

20 yıl kadar önce miRNA'ların varlığı ve önemi bilinmemekteydi. miRNA'ların önemine ilişkin ilk veriler 1993 yılında ortaya konulmaya başlandı (25).

Ceanorhabditis elegans adlı nematodda, larva dönemlerinin zamana bağlı gelişimi ve düzenlenmesini kontrol eden genlerden biri olan *lin-14* geninin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların varlığında, yetişkin yapılarında çeşitli bozukluklar ve larval gelişimde sorunlar olduğu gözlenmiştir. Yine daha önce yapılan çalışmalarla, gelişimsel öneme sahip bir başka gen olan *lin-4*'ün, *lin-14* geninin regülasyonunda etkin olduğu ortaya çıkartılmıştır (26). Bu sonuçlar ışığında iki ayrı çalışma grubundan Ambros ve arkadaşları *lin-4* geni üzerine yoğunlaşmayı seçerken, Ruvkun ve ekibi *lin-14* geni üzerine çalışmaya başlamışlardır. Ambros, Lee ve Feinbaum ile birlikte "open reading frame" olarak kabul

edilen kısımda “site-directed mutagenesis” yoluyla elde edilen mutasyonların *lin-4* geni fonksiyonunu değiştirmediğini ortaya koymuşlardır. Bۆylece, *lin-4* geninin protein kodlamayacağı sonucuna varmışlardır (25). Ayrıca, elde edilen RNA’lardan birinin 22 nt, diğerinin ise 61 nt uzunluğunda olduğu gۆzlenmiřtir. Uzun olanın; sap kısmından ilmik oluşturacak şekilde kıvrılmış yapıda olduğu (*stem loop*) ve kısa olan RNA’nın prekürsörü olabileceği tahmin edilmiştir. Ruvkun ve arkadaşları, *lin-14* geninin post-transkripsiyonel aşamada baskılanabileceğini ve 3’ UTR bۆlgesinin bu gelişimsel regۆlasyonda tek başına yeterli rol oynayabileceğini bulmuşlardır (27). Bۆylece elde ettikleri verileri paylaşan Ambros ve Ruvkun ekipleri; *lin-4* geni RNA’larının *lin-14* geni 3’UTR bۆlgesindeki çeşitli alanlara komplementerlik gۆsterdięini bu durumun *lin-4* gen ۆrünü ile *lin-14* ifadesinin baskılanması şeklinde ortaya çıktığını vurgulamışlardır (25, 27).



şekil 2.6. *lin-4* miRNA’ sının *lin-14* geninin 3’ UTR bۆlgesine bağlanarak translasyonunu baskılamasını gۆsteren şekil (28).

Lin-4 geni ile ilişkili RNA’nın keşfinden 7 yıl sonra gelinen noktada, nematodlarda başka “kodlanmayan RNA’lar” bulunmazken, nematodlar dışındaki canlılarda da *lin-4* benzeri RNA ۆrneklerine rastlanmamıştır. Bu durum, *C. elegans*’nın gelişimsel zamanlamasını kontrol eden genlerden biri olan *let-7*’nin keşfedilmesiyle değişmiştir. *Let-7* geni de yaklaşık 22 nۆkleotidlik bir RNA kodlamakta ve bu RNA, tıpkı *lin-4*’de olduğu gibi, nematodun geç larval evreden yetişkin hale geçmesinde, yani gelişimin zamansal

kontrolünde etkili olmaktadır. 2000 yılında yapılan bu çalışma ile *let-7* geninin aktivitesinde kayıp yaşandığında larval hücrelerin yetişkin evrede tekrar gözlendiği, *let-7* geni aktivitesi artışında ise erken gelişmelerin olduğu saptanmıştır. Yine *let-7* genin, larval gelişimde etkili olan *lin-41* geninin 3'UTR bölgesi üzerinde iki farklı yere komplementer olduğu gözlenmiştir (29). Daha sonra yapılan çalışmalarda *lin-4* geninin aksine *let-7* genin evrimsel olarak, sinekten insana kadar uzanan farklı türler arasında korunduğu anlaşılmış ve miRNA'ların diğer organizmalarda da önemli olabileceğine dair ilk bulgular elde edilmiştir. Örneğin insanlarda, içlerinde beyin, timüs, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak gibi organların da olduğu pek çok dokuda farklı ifade düzeylerinde tespit edilmiştir (30).

Larval gelişimin zamansal kontrolündeki rolleri nedeniyle *lin-4* ve *let-7* gibi genler öncelikli olarak “small temporal RNA” (küçük zamansal RNA'lar) (stRNA) olarak adlandırılmışlardır. Bununla birlikte bir yıl gibi bir süre içerisinde, insan, hayvan ve sinek hücrelerinde küçük RNA'ları klonlayan üç farklı laboratuvarında yaklaşık 100'ün üzerinde gen bulunmuş ve *Drosophila*'da 20, insanda 30, solucanlarda 60 yeni “kodlanmamış RNA'ya “ ilişkin gen tespit edilmiştir. Keşfedilen genler ilmikli bir prekürsör yapıya sahip RNA sentezine neden olmakta, çoğunlukla evrimsel olarak korunmakta ve *lin-4* ve *let-7*'ye yapısal olarak benzemekle beraber, farklı olarak pek çoğunun değişik gelişimsel evreler sırasında ifade edilmediği, daha çok belirli hücre tiplerinde ifade edildikleri fark edilmiştir. Böylece, bu fonksiyonları tam olarak anlaşılamayan yapılar için “mikroRNA” ifadesi kullanılmaya başlanmıştır (28).

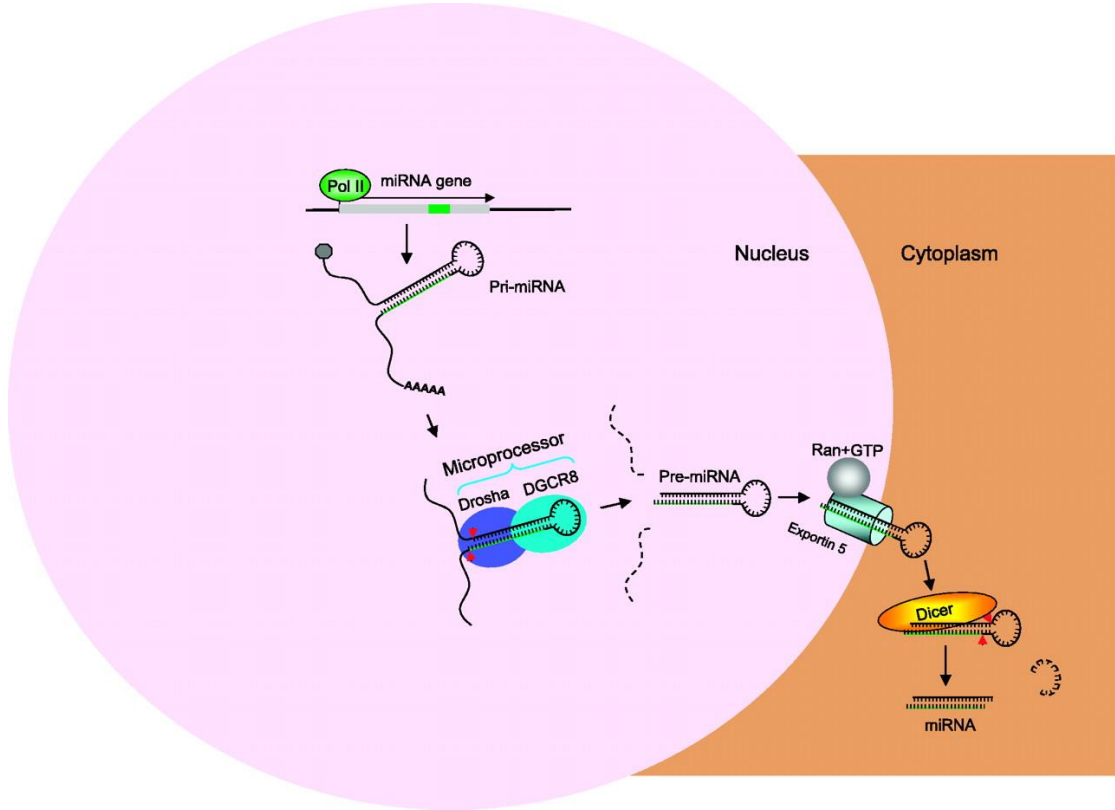
2.2.2. MikroRNA Biyogenezi

mikroRNA'lar, üç aşamada meydana gelir. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür ve son adımda sitoplazma içinde olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.7) (31).

mikroRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), cap (şapka) ve poli A kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (32). Çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan

Pasha'nın bir nükleaz olan Drosha ile oluşturduğu komplekse mikroşlemci kompleks adı verilir (33).

Pre-miRNA bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (34). Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir (35). Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu da başlatır (36). Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA:miRNA dubleksinden sadece biri oluşan RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonotun (AGO) etkisiyle iki iplikten genelde 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir (kılavuz iplik). Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. mikroRNA'lar RISC kompleksine dahil olduktan sonra, ya argonot (AGO) proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (37).



Şekil 2.7. miRNA biyogenezinin basamaklarını gösteren şekil (38).

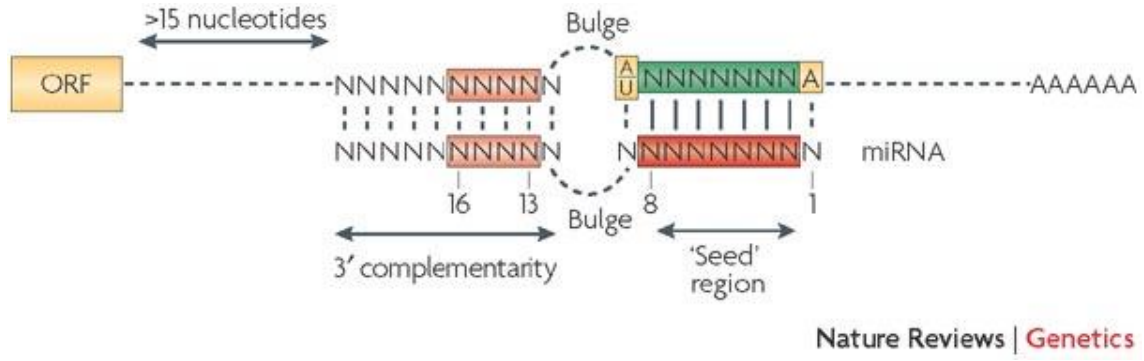
miRNA dupleksinin her iki zinciri de eşit etkiye sahip değildir ve hangi zincirinin olgun miRNA olacağına dair karar kalıtsal etkenlerin ışığında belirlenir. Bu durumda etken olan en önemli özellik termodinamik etkileşimlerdir (39). Genellikle miRNA'nın daha stabil olan 5' ucuna sahip zinciri olgun miRNA olarak seçilirken, diğer zincir degrade olur (40). Yine de günümüzde ileri sekanslama yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar miRNA* olarak ifade edilen ve mRNA ile birleşmeyen yapının her zaman degrade olmadığını ve etkin olabileceğini ortaya koymuştur (41).

2.2.3. MikroRNA'ların Etki Mekanizması

Olgun mikroRNA'lar; ortalama 20 nükleotid uzunluğa sahip, kodlanmamış RNA (non-coding RNA) özelliğinde ve tek zincirli yapılardır. Gen ekspresyonunu; hedef mRNA'nın genellikle translasyona uğramayan 3'UTR kısmına, bazen de 5' UTR bölgesine bağlanarak, post-transkripsiyonel gen regülasyonu şeklinde etkilerler (42, 43).

mikroRNA'lar gen ifadesini; mRNA parçalanması veya translasyonunun inhibisyonu şeklinde iki yolla durdurabilirler (42).

mRNA'ya tam olarak komplementerlik ve bağlanma görülen durumlarda, *mRNA parçalanması ile* gen ifadesinin susturulması gözlenir (44). mRNA parçalanması gerçekleştiğinde, kesim kısmı miRNA'nın 10 ve 11 numaralı birimleri ile nükleotid çifti arasındadır. Komplementerlik tam sağlanamasa da bu durum değişmez. miRNA'nın 2-8 numaralı nükleotidleri arasındaki bölge "seed" bölgesi olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge mRNA ile bağlantının birebir olduğu, miRNA tahminlerinin de yapılmasını sağlayan bir bölgedir (Şekil 2.8) (45). Bu bize, kesim veya parçalanma noktasının hedef ile miRNA arasındaki baz çifti bağlantısıyla alakalı değil, miRNA'daki birimlerle ilişkili olduğunu göstermektedir, yani önemli olan doğru birimlerdeki komplementerlik durumudur. mRNA parçalanması işleminden sonra miRNA bir bütün olarak kalır ve işlevini devam ettirebilir (42).



Şekil 2.8. miRNA'nın hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanması (45).

2.2.4. MikroRNA'ların Adlandırılması ve miRBASE Veritabanı

mikroRNA'lar, son ürünü yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda fonksiyonel bir RNA olan ve kodlanmamış (non-coding) RNA gen ailesinin bir üyesi halinde yapılardır. Hedef genlere ait mRNA'ların komplementer bölgelerine bağlanarak, mRNA degradasyonun veya translasyonun baskılanmasını sağlayıp gen ifadesinin kontrolünde rol alırlar. miRNA biyogenezi büyük oranda aydınlatılmış durumdadır. Hayvan hücrelerinde miRNA ekspresyonu iki basamakta olmaktadır. miRNA'lar pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler halinde sentezlenirler. Bu transkriptler birden fazla miRNA içerebilirler. Daha sonra saç tokası yapısı içeren yapılara dönüşürler ve RNase III benzeri bir enzim olan Dicer ile işlenmek üzere sitoplazmaya salınırlar. “miR” ile simgelenen olgun miRNA pre-mir adı verilen, saç tokası yapısına sahip sekans üzerinden oluşturulmuştur (46, 47).

miRNA sekanslarını isimlendirmek ve ulaşılabilirliği olması amacıyla “miRBASE” veritabanı oluşturulmuştur. miRBASE veritabanı genelde senede bir defa tamamen güncellenerek yeni sürümünü (release) yayımlamaktadır. En son 2013 yılının Haziran ayında 20. sürümü yayımlanmıştır.

miRBASE veritabanına, isimlendirme sırasında karmaşa olmasını engellemek ve veritabanını etkili kılmak amacı ile, sadece keşfi kanıtlanmış ve keşif yöntemleri anlatılarak bir makale ile yayımlanmış mikroRNA'lar kaydedilmektedir. Buna göre sistem, yeni keşfedilmiş miRNA'ların deneysel olarak klonlanmasını, ifade ve işlevlerinin kanıtlanmasını gerektirir. mikroRNA isimleri üç-dört harflik kısaltmalardan ve rakamlardan oluşur. Tür isimleri üç harflik bir kısaltma ile ismin en önünde yer alır. Örneğin; insana ait bir mikroRNA için (*homo sapiens*) “hsa” kısaltması kullanılır. Yine “hsa-miR-100-1” örneğinde olduğu gibi “miR” kısaltmasının kullanılması, olgun bir

miRNA olduğunu belirtirken “*mir*” kısaltması bahsi geçen sekansın *pre-miRNA*'ya ait olduğunu vurgular (46, 47).

“100” rakamı ise keşif sırasına göre “101” rakamlı mikroRNA'dan daha önce bulunduğunu gösterir. “1” veya “2” gibi rakamlar genomun farklı noktasından ifade edilmiş iki farklı *pre-miRNA*'ya ait olgun miRNA'ların birebir aynı olduğunu, “100a” ya da “100b” gibi ifadeler ise olgun miRNA'ların bir iki nükleotid dışında hemen hemen benzer sekanslara sahip olduklarını gösterir (46, 47).

miRNA* olarak isimlendirilen yolcu iplik yapısının her zaman degrade olmadığını ortaya çıkartılması (41) , ayrıca programlarda ve aramalarda * işaretiyle alakalı yaşanan problemler nedeni ile miRNA-miRNA* isimlendirme sistemi Nisan 2011'de yayımlanan 17. sürümde değiştirilmiştir. Yeni isimlendirme sisteminde miRNA adlarının sonuna hangi kola (3' veya 5') ait olduğuna göre -3p ve -5p getirilmeye başlanmıştır. Ancak kayıtlı her miRNA için bu isim değişikliği henüz gerçekleştirilememiştir (48). Henüz tam olarak standart bir sistem oturtulmadığı için miRNA isimlendirmesi çeşitli karışıklıklara yol açabilmektedir.

Günümüz itibarıyla miRBASE veritabanında 24521 kayıt yer almaktadır.



Şekil 2.9. miRBASE veritabanında insan *pre-miRNA*'sı hsa-mir-1-1'e ait ekran görüntüsü (48, 47).

2.3. MikroRNA ve Meme Kanseri

miRNA'lar ilk kez 2001 yılında potansiyel regülatör rolleri olan küçük RNA molekülleri olarak keşfedilmiş ve mikro RNA (miRNA) olarak adlandırılmışlardır (28). miRNA ifadelerinin kanserlerde genellikle disregüle olduğunun bulunması bu molekülleri öncelikli hale getirmiştir. miRNA'ların kanserde potansiyel regülatör rolünde olabilecekleri bazı önemli gözlemler ile ortaya atılmıştır. İlk miRNA *C. elegans* ve meyve sineği *Drosophila*'da bulunmuş ve hücre çoğalmasını ve ölümünü kontrol ettikleri gösterilmiştir (25, 49). Bu da miRNA disregülasyonlarının kanser gibi proliferatif hastalıklara katkı sağlayacağını akla getirmiştir. Bir başka bulgu da miRNA'ların genellikle genomun kırılgan bölgelerinde ya da kanserlerde genellikle silinen ya da artan bölgelerde yer aldıklarıdır (50). Üçüncü olarak tümör dokularında ve kanser hücre hatlarında, normal ile kıyaslandığında daha fazla kontrolsüz miRNA ifadesi olduğu bulunmuştur (51, 52). Her ne kadar bu gözlemler miRNA'ların kanserde potansiyel düzenleyici rolü üstlenebileceğini gösterse de miRNA'ların maligneteye dönüşümde sebep mi sonuç mu olduğu hala tartışılmaktadır.

miRNA molekülleri aşağıda belirtilen sebeplerden dolayı potansiyel kanser biyobelirteçleri olarak adlandırılabilirler.

- miRNA ifadelerinin kanserlerde anormal seyrettiği bilinmektedir (53, 54).
- miRNA'lar hastalığa ya da dokuya özel ifade profilleri göstermektedirler (54).
- miRNA'lar, taze dondurulmuş, formalin ile tespit edilmiş ya da parafine gömülmüş dokularda iyi korunduğu gösterilmiş kararlı ve dayanıklı moleküllerdir (55, 56).
- miRNA'ların meme kanserinin östrojen ve progesteron reseptör ifade seviyesi, tümör evresi, invazyon ve çoğalma indeksi gibi klinik özellikler ile ilişki içerisinde olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (57, 58, 59, 60).

Literatürde meme kanserinde miRNA ifade profillerini araştıran mikrodizin çalışmaları yer almaktadır (57, 61, 60, 24, 62). Bu çalışmaların yanında, içinde meme kanserinin de yer aldığı birçok kanser türüne aynı anda bakan miRNA ifade profili çalışması da bulunmaktadır (63, 54).

Meme kanseri konusunda yapılan miRNA ifade çalışmaları, miRNA'ların meme kanserini sınıflandırmada ve hastalığın gidişatını belirlemede önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. 6 meme tümörü ve 34 normal doku ile yapılan mikrodizin çalışmasında

tümör ve normal dokuları birbirinden farklı ifade profilleri ile ayırt edebilen 29 tane miRNA tanımlanmıştır ve ek olarak 15 miRNA'nın da meme tümörünü normalinden ayırt ettiği kantitatif PZR ile gösterilmiştir (57). Ayrıca miRNA ifade profillerinin ER ve PR ifadesi (miR-30) ve tümör derecesi (miR-213 ve miR-203) gibi patolojik verilerle de ilişkili olduğu gösterilmiş (61) ve bu çalışmalara ek olarak erken meme kanserlerinde miR-195 ve miR-154 ifadeleri ER pozitivitesiyle ters ilişkili olarak bulunmuştur (60). Romero-Cordoba ve arkadaşları, 29 meme tümör dokusu ve 21 meme normal dokusu ile çalışmış ve tümör dokuyu normalden ayırabilen 130 tane miRNA olduğunu göstermişlerdir. Bulunan miRNA'ların hedef genleri ile yapılan yolak analiz çalışmaları ERBB2, YY1 gibi onkogenleri, bazı MAP kinazları ve FOXA1 ve SMAD4 gibi bilinen bir takım tümör baskılayıcı genleri işaret etmiştir (24).

Meme Kanseri ve Let-7 Ailesi

İfade çalışmaları, miRNA'ların meme kanserini de içeren birçok kanser tipini sınıflandırmada önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Bu miRNA'lara örnek olarak let-7 ailesinin üyeleri verilebilir.

Meme kanserinde önemli bir aile olan let-7 ailesi çeşitli kanser tiplerinde ifade değişikliği gösterdiği bilinen miRNA'lardan oluşmaktadır. İnsanda 10 tane üyesi vardır (64). Meme kanserini de içine alan çeşitli kanser tiplerinde let-7 ailesi üyelerinin miktarı azalmıştır. Akciğer kanseri hücre hatlarında let-7 ailesinin ifade artışının hücre döngüsünün ilerleyişini baskıladığı ve hücre bölünmesini azalttığı görülmüştür. Tümör gelişimini kontrol eden let-7 mekanizması Ras, HMGA2 ve kaspaz genlerini hedef alarak etki etmektedir (65, 66). Ayrıca siklin D1, D3, A, CDK441, CCNA2, CDC25A, CDK6, CDK8 gibi birçok önemli hücre döngüsünü kontrol eden gen de let-7 ailesi tarafından baskılanmaktadır. Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada kendi kendine yenilenen ve farklılaşmış hücrelerdeki miRNA ifadeleri karşılaştırılmış ve let-7 ailesi ifadesinin memedeki tümör başlatıcı hücrelerde azaldığı gösterilmiştir ve memedeki tümör başlatıcı hücrelere let-7 uygulaması metastaz kapasitelerinin azalmasına neden olmuştur. Let-7 ailesinin onkogenik hedefleri arasında H-RAS ve HMGA2 bulunmaktadır ve let-7'lerde ifade artışı görülen durumda bu genlerin ifadeleri azalmaktadır. MAPK inhibisyonu MYC tarafından LIN28 transkripsiyonunu azaltmaktadır ve let-7 biyogenez inhibitörü olan LIN28'in ifadesinin let-7 ifadesinin arttığı durumda meme kanser hücrelerinde azaldığı görülmüştür (67, 68, 69, 65, 66, 70).

2.4. Mikrodizin Yöntemi

Moleküler biyolojideki geleneksel metotlar genellikle bir deneyde bir lokus analizi ile sınırlıdır (71). Bu demektir ki gen fonksiyolarının bütün resmini görmek bu yöntemlerle zordur. Mikrodizin teknolojisi ile bir organizmaya ait bütün genom bir çip üzerinde görüntülenebilmekte ve bu sayede aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan etkileşimlerini görmek mümkün olmaktadır.

Bir zemin üzerinde sabitlenmiş sentetik gen dizileriyle serbest nükleik asitleri melezleştirme (hibridizasyon) düşüncesi moleküler biyolojinin önemli adımlarından biri olmuştur. DNA mikrodizin yöntemi aktif proteinlere çevrilebilen ya da çevrilemeyen RNA'ların saptanmasında kullanılabilir ve bu tip analizler "ifade analizi" şeklinde adlandırılır (72).

2.4.1. Mikrodizinin Tanımı ve Temeli

Mikrodizin genellikle silikon, naylon membran veya cam yapıdaki katı yüzeyler (çip) üzerinde küçük alanlara yerleştirilmiş milyonlarca birbirine denk tek iplikli DNA parçacıkları (prob) aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon temeline dayanan bir yöntemle incelenmesi tekniğidir. Bu yöntem ile bir organizmanın tüm genleri çok küçük bir alanda incelenebilir ve binlerce genin ifade seviyeleri aynı anda çalışılabilir.

Mikrodizin teknolojisi DNA'nın bilinen bir gen ya da fragment ile hibridizasyonu temeline dayalı "Southern Blot" tekniğinden türetilmiştir. Membran yerine cam vb. katı yüzeylerin kullanılması ve sağlığa zararı bilinen radyoaktif işaretleme yönteminin yerini fluoresan işaretlemenin alması ve bağlanmayı sağlayan yöntemlerin hassaslaştırılması ile çalışmaların verimi ve dolayısıyla elde edilen bilginin de miktarı artmıştır (72).

Yüzeye tutturulan bu DNA segmentlerinin (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) binlercesi tek bir çipte birlikte kullanılabilir. Uygulanan yöntem ve amaç farklılıkları olmakla birlikte, "mikroçip", "DNA çip" ve "DNA array" gibi tanımlamalar da benzer uygulamaları ifade etmek için kullanılırlar.

2.4.2. Mikrodizin Teknolojisinin Kullanım Alanları

Mikrodizin teknolojisi aynı anda binlerce gen tespiti sağlayan yüksek işlem hacimli bir yöntemdir. Bu nedenle; gen ifadesi farklılıklarının tespiti (normal-hasta), hastalık tanısı,

mutasyon ve polimorfizm tespiti, patojen analizi, farmakogenetik (ilaç keşfi), toksikogenomik çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır

2.4.3. Mikrodizin Platformları

Mikrodizin teknolojisi için kullanılan çipler günümüzde çok çeşitli firmalar tarafından üretilmektedir. Bu firmalar araştırmacıların istedikleri çipleri de tasarlayabilmektedir. Affymetrix, Illumina, Agilent ve Roche NimbleGen bu firmalardan en bilinenler arasında sayılabilir.

Mikrodizin verilerinin kıyaslanabilir hale getirilmesi, sistemik sorunların elimine edilmesi ve böylece biyolojik farkın korunması amacı ile gerçekleştirilen işlemlerin tümü “ön işleme” olarak adlandırılmaktadır. Ön işleme; arka planın çıkarılması (Background correction), normalizasyon (Normalization) ve özetleme (Summarization) olarak 3 aşamadan oluşmaktadır (73). Spotlardan gelen sinyaller çoğu zaman sadece veriye ait olmayıp; işaretli örneklerin spesifik olmayan bağlanmaları, yıkama aşamasından kaynaklı artıklar ve tarayıcı kaynaklı arka plan gürültüsünü de barındırmaktadır. Doğru veri analizinde “background correction” başlığı altında bu gürültü elimine edilir. Normalizasyon adımının amacı ise örneklerdeki ifade değerlerinin aynı koşullarda elde edilememiş olması nedeniyle doğru karşılaştırma ortamı yaratabilmek için karşılaştırılabilir hale getirmektir. Her gen prob seti dediğimiz 11-20 arasında değişen sayıdaki problemlerle ifade edildiğinden özetleme aşamasında aynı prob setine ait prob değerleri tek bir ifade değeri verecek şekilde özetlenir (74). Ön işleme yöntemlerine örnek olarak Affymetrix firmasının yalnızca kendi prob tasarımına uygun olarak geliştirdiği MAS5 ve son yıllarda çok tercih edilen, aynı zamanda farklı platformlar için güvenli sonuç veren RMA (Robust multiarray algorithm) verilebilir.

2.4.4. Mikrodizin Veritabanları

Mikrodizin ham verilerinin, hatta deneylerde kullanılan örneklerin klinik ve/veya patolojik özelliklerinin bulunduğu veritabanları bulunmaktadır. Bu veritabanları, çalışmaların verilerinin ve yapılaş şekillerinin belli bir standartta ulaşılabilir olması için koyulan MIAME (Minimum information about a microarray experiment) kriterleri doğrultusunda veri ve bilgi paylaşımı yapmaktadır (75).

MIAME kriterlerine göre ham veri, işlenmiş veri, deney ile ilgili doz vb. temel bilgiler, örnek-veri ilişkileri de dahil olmak üzere deneysel tasarım, platform ile ilgili gen

tanımlayıcılar ve genomik koordinatlar gibi anotasyon bilgileri, gerekli laboratuvar ve veri işleme protokolleri (ör: normalizasyon yöntemi) bu veritabanlarında ulaşılabilir olmalıdır (75).

Bu halka açık veritabanlarından en önemlileri şunlardır;

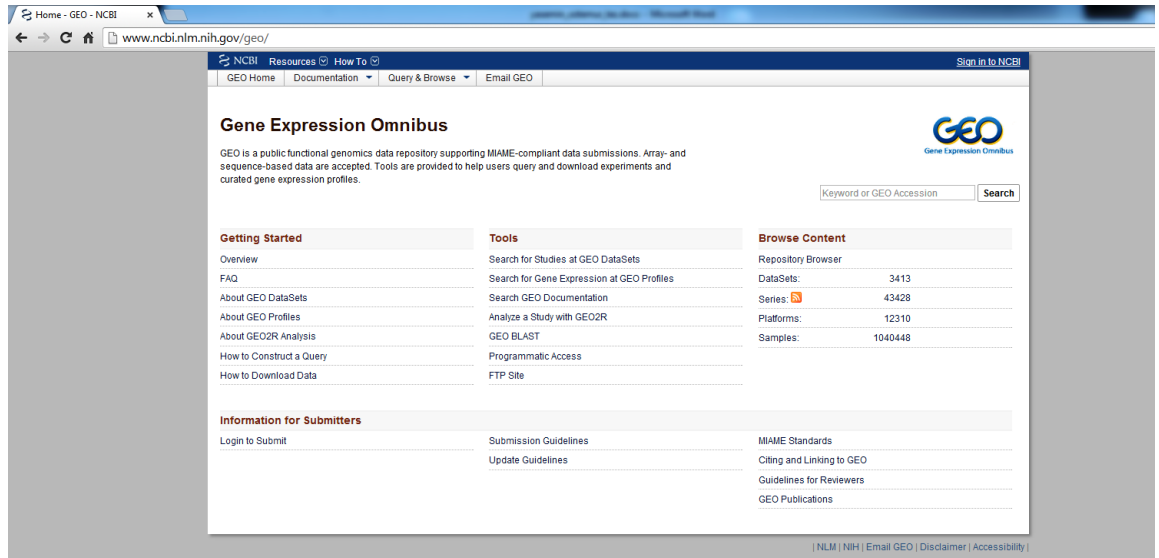
- Gene Expression Omnibus: GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
- ArrayExpress; <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

Gene Expression Omnibus: GEO

Gene Expression Omnibus Amerika kökenli ve dünyanın en kapsamlı biyolojik veritabanı olan NCBI'nın (National Center for Biotechnology Information) altındaki mikrodizin veritabanıdır.

Günümüz itibariyle bu veritabanında 43431 çalışma (bu çalışmaların 3413 tanesi GEO çalışanlarınca kontrol edilmiş olan “dataset” lerdir.), bu çalışmaların içinde toplam 1040448 tane örnek ve 12310 çeşit platform bulunmaktadır.

GEO veritabanını kullanarak çalışmalar ve çalışmanın yapıldığı platform hakkında kapsamlı bilgi edinmek, bu platformda yapılan başka çalışmalara erişmek, örneklerin klinik bilgilerine ulaşmak ve basit analizler yapmak mümkündür.



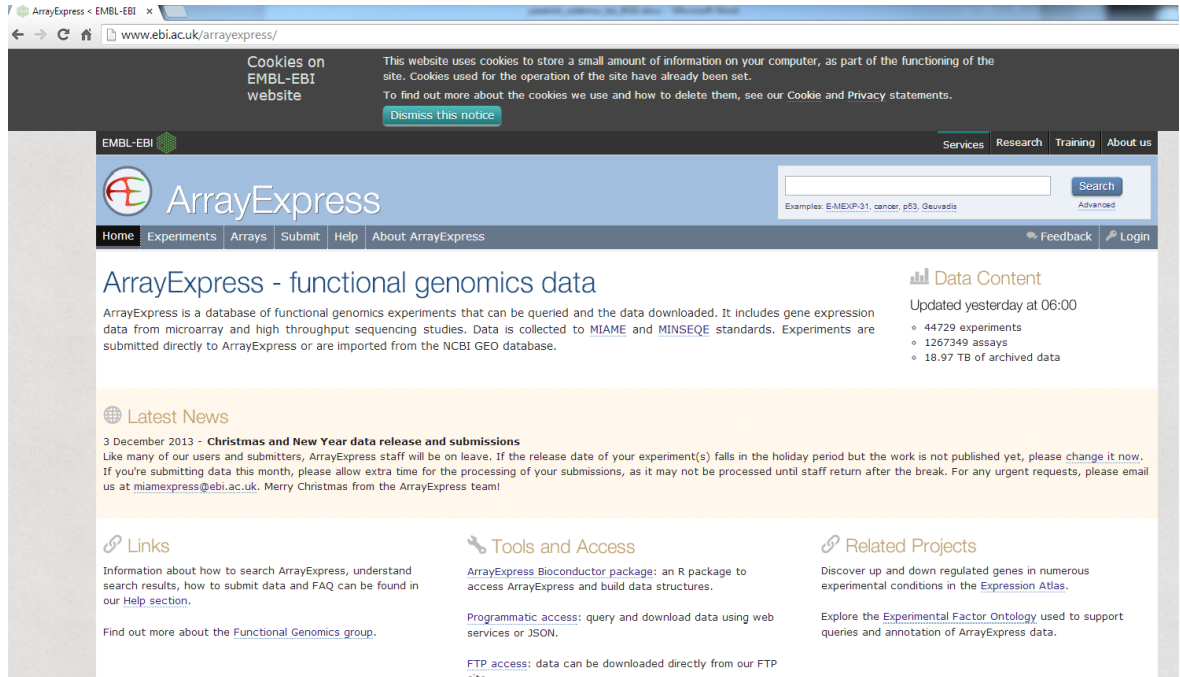
Şekil 2.10. GEO veritabanının ana sayfasına ait ekran görüntüsü (76).

ArrayExpress

ArrayExpress Avrupa kökenli büyük ve kapsamlı bir biyolojik veritabanı olan EBI'nın (The European Bioinformatics Institute) altındaki mikrodizin veritabanıdır.

Günümüz itibariyle bu veritabanında 44718 çalışma ve bu çalışmaların içinde toplam 1266435 tane örnek bulunmaktadır.

ArrayExpress veritabanını kullanarak da çalışmalar ve çalışmanın yapıldığı platform hakkında kapsamlı bilgi edinmek, bu platformda yapılan başka çalışmalara erişmek, örneklerin klinik bilgilerine ulaşmak ve basit analizler yapmak mümkündür.



The screenshot shows the ArrayExpress website homepage. At the top, there is a navigation bar with links for 'Services', 'Research', 'Training', and 'About us'. Below this is a search bar with a 'Search' button and a 'Login' button. The main content area is titled 'ArrayExpress - functional genomics data' and includes a brief description of the database. To the right, there is a 'Data Content' section with a bar chart icon and statistics: 'Updated yesterday at 06:00', '44729 experiments', '1267349 assays', and '18.97 TB of archived data'. Below this is a 'Latest News' section with a date of '3 December 2013' and a title 'Christmas and New Year data release and submissions'. There are also sections for 'Links', 'Tools and Access', and 'Related Projects'.

Şekil 2.11. ArrayExpress veritabanının ana sayfasına ait ekran görüntüsü (77).

2.5. Meta-analiz

Meta-analiz, aynı konuda farklı yer, zaman ver merkezlerde yapılmış olan araştırma sonuçlarını niteliksel ve niceliksel olarak birleştirmeye yardımcı olan istatistiksel bir yöntemdir (78).

Veritabanlarına yüklenmiş olan bağımsız mikrodizin ham verilerinden daha fazla bilgi sağlamak meta-analiz yöntemiyle mümkün olmakta ve var olan veriyi değerli kılmaktadır. Ciddi bütçelerle yapılan mikrodizin çalışmalarının çeşitli meta-analiz yöntemleriyle bir araya getirilmesi her bir çalışmanın kendi başına ortaya çıkartamayacağı sonuçların

alınmasında önemlidir. Örneğin meme kanserinde farklı ifade edilen transkriptlerin bulunmasına yardımcı olurken, meme kanseri oluşumunu ve gelişimini daha iyi anlayabilmek için kullanılacak genellenmiş ve sabit biyobelirteçler elde edilmesine de olanak sağlamaktadır. Meta-analiz çalışması pek çok veriyi bir araya getirme şansı tanıdığı için, elde edilen sonuçlar yalnızca bir vakaya özel değildir ve daha genel bilgiyi yansıtmaktadır.

Meta-analiz yönteminde, farklı çalışmalardan elde edilen verilerin bir araya getirilmesi aşamasında en büyük problem verilerin farklı platformlardan geliyor olmasıdır ve çoğu meta-analiz yaklaşımında farklı platformlara ait verilerin birbirleriyle kıyaslanabilir hale getirilmesi için ortak bir normalizasyon yönteminden geçirilmeleri gerekmektedir. GEO ve ArrayExpress gibi veritabanlarından ham verilere ulaşmanın en büyük faydası karar verilen normalizasyon yönteminin işlenmemiş verilere eşit koşullarda uygulanabilmesidir.

Genel anlamda meta-analiz yaklaşımları iki büyük grupta incelenebilir. Bunlardan ilki çalışmaların önce bireysel olarak analiz edilmesi ve sonrasında sonuçların istatistiksel yöntemler kullanılarak bir araya getirilmesidir, ikincisi ise çalışmaların ham verilerinin hiçbir işlemlemeden geçirilmeden ve bütün farklılıklar yok sayılarak bir araya konulması ve tek bir çalışma gibi analiz edilmesidir (Naive meta-analiz yöntemi). Bu yöntem, çalışmaların farklı laboratuvarlarda, farklı platformlarda ve farklı zamanlarda gerçekleştirildiği düşünülürse istatistiksel yöntemlerle güçlendirilen diğer yöntemlere göre daha fazla veri kaybına sebep olabilir.

Bu genel gruplandırmanın altında meta-analiz yöntemleri çok çeşitli ve birçok parametreye bağlı olarak neredeyse her çalışmanın kendisine özgüdür. Çalışmaların yapılış şekline göre bir araya getirilirken bazı etkiler yok sayılmakta, bazıları ise dahil edilmektedir (ör: platform etkisi).

Meta-analiz yöntemleri farklı kanser tiplerinde ve çeşitli hastalıklarda her geçen gün daha fazla kullanılmaktadır. Meme kanserinde de meta-analiz çalışmaları çok fazla olmamakla birlikte sayısı ve değeri gün geçtikçe artmaktadır.

- 2012 yılında Phan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 6 veri seti kullanılmıştır ve örnekler ER statülerine göre gruplandırılmışlardır (79).

Çizelge 2.1. Çalışmada meta-analizde kullanılan gen ifade veri setlerini, örnek sayılarını ve platformları gösteren tablo (79).

Dataset	ER+	ER-	Platform
MDACC Train	80	50	Affy HG-U133A
MDACC Test	60	40	Affy HG-U133A
Miller	213	34	Affy HG-U133A
Sotiriou	72	24	Affy HG-U133A
Minn	57	42	Affy HG-U133A
Van't Veer	226	69	Agilent 2-Color

Çalışma oldukça kapsamlıdır, meme kanseriyle birlikte böbrek ve pankreas kanserlerini de içmektedir. Verileri bir araya getirmek için kendi geliştirdikleri sıralama tabanlı “Rank average” metoduyla birlikte, başka çalışmalarda denenmiş olan beş ayrı (mDEDS, rank products, Choi, Wang ve naive) meta-analiz yöntemi daha uygulanmıştır. “Rank average” sıralama tabanlı bir yöntem olduğu için özellikle platform farklılıklarının elimine edilmesinde avantajlı bir yöntemdir. “FC, T, SAM, RS, mRMRD, mRMRQ” gibi altı ayrı istatistiksel anlamlılık testinden elde edilen sıralamaların birleştirilmesiyle oluşturulduğu için de oldukça güvenilirdir (79).

- 2008 yılında Smith ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yine ER statülerine göre gruplanmış 9 veri seti kullanılmıştır (80).

Çizelge 2.2. Meta-analizde kullanılan gen ifade veri setlerinin alındığı çalışmayı, yayımlandığı dergiyi, çalışmanın gerçekleştirildiği platformu, ER+ ve ER- örnek sayılarını gösteren tablo (80).

Author	Journal	Array Type, N Probes	Sample N ER+	Sample N ER-
Wang, Y. et al.	Lancet [73]	Affy, 22283	209	77
Zhao, H. et al.	Mol Biol Cell [80]	cDNA, 27276	24	11
Sotiriou, C. et al.	PNAS [81]	cDNA, 7549	65	34
Ma, X. et al.	PNAS [82]	cDNA, 1940	18	5
Van de Vijver, M. et al.	NEJM [83]	cDNA, 23130	226	69
Gruvberger, S. et al.	Ca Res [84]	cDNA, 3369	28	30
Sorlie, T. et al.	PNAS [2]	cDNA, 7937	56	18
West, M. et al.	PNAS [85]	Affy, 6718	25	24
Perou, C. et al.	PNAS [1]	cDNA, 8838	26	9

Bu çalışmada verileri bir araya getirmek için p değerlerinin birleştirilmesinde kullanılan Fisher metodu;

$$X^2 = -2 \sum_{i=1}^k \log_e(p_i),$$

Modifiye edilerek;

$$S = -2 \sum_{j=1}^m C_j \ln p_j,$$

formülü kullanılmıştır.

c sabiti burada gen ifadesi ER- 'lerde ER+'lere göre daha fazlaysa +1, tersi durumda ise -1 olarak alınır (80).

- 2008 yılında Thomassen ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada metastatik olan ve metastatik olmayan meme kanseri tümörlerinde farklı düzenlenen yolların tanımlanması için “yolak analizi üzerinden meta-analiz” çalışması yapılmıştır. Her çalışma için yolak analizi yapılmış ve bu yollarda ifadesi artan ve azalan gen sayıları bulunmuştur (81).

Çizelge 2.3. GenMAPP programı ile istatistiksel olarak anlamlı bulunan yollar (81).

Yolak	Ams	Hua	HUM	Rot	S03	S06	Sto	Upp	ORTALAMA	p	FDR
Up-regulated											
Hs_Cell_cycle_KEGG	1	97	2	1	1	4	1	1	13.5	< 10E-6	9.0E-5
Hs_Cell_Cycle-G1_to_S_control_Reactome	3	51	21	13	5	7	8	11	14.9	< 10E-6	9.0E-5
Hs_DNA_replication_Reactome	2	124	3	8	6	10	2	3	19.8	5.0E-6	3.0E-4
Hs_Electron_Transport_Chain	73	9	34	2	35	11	4	2	21.3	1.0E-5	4.4E-4
Hs_Androgen-Receptor_NetPath_2	82	12	9	16	20	5	43	19	25.8	4.6E-5	1.3E-3
Hs_I-Tissue-Embryonic_Stem_Cell	6	157	1	4	22	3	13	4	26.3	5.2E-5	1.3E-3
Hs_mRNA_processing_Reactome	45	22	64	6	33	26	9	5	26.3	5.2E-5	1.3E-3
Hs_Citrate_cycle_TCA_cycle_	18	23	81	40	7	35	11	21	29.5	1.5E-4	3.3E-3
Hs_Aminoacyl_tRNA_biosynthesis	19	101	84	32	10	13	3	8	33.8	4.7E-4	9.3E-3
Hs_Cholesterol_Biosynthesis	28	119	7	41	13	56	6	24	36.8	1.0E-3	1.8E-2
Hs_Hedgehog_Netpath_10	41	5	4	21	99	18	76	65	41.1	2.7E-3	4.3E-2
Down-regulated											
Hs_Adipogenesis	4	22	41	43	16	58	2	1	23.4	2.5E-5	4.4E-3
Hs_EGFR1_NetPath_4	5	3	42	44	24	13	13	80	28.0	1.0E-4	8.9E-3
Hs_T-Cell-Receptor_NetPath_11	37	2	75	6	38	28	19	51	32.0	3.0E-4	1.8E-2
Hs_Smooth_muscle_contraction	30	51	36	23	34	50	12	44	35.0	6.6E-4	2.4E-2
Hs_Insulin_Signaling	15	11	54	64	39	47	16	39	35.6	7.7E-4	2.4E-2
Hs_IL-6_NetPath_18	16	8	163	3	41	7	26	23	35.9	8.1E-4	2.4E-2
Hs_IL-7_NetPath_19	7	5	141	9	19	15	28	78	37.75	1.3E-3	3.0E-2
Hs_IL-3_NetPath_15	58	7	56	18	32	29	44	61	38.125	1.4E-3	3.0E-2

Yapılan yolak analizi sonucunda birleştirilen verilere göre; DNA hasar ve onarım yolağının metastatik meme tümörlerinde ifadesi artmıştır, kontrolsüz hücre döngüsü normal hücrelerle karşılaştırıldığında metastatik hücrelerde karakterizedir (81).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Meme kanseri tek bir faktöre bağılı olmayan pek çok değişken tarafından kontrol edilen bir hastalıktır. Bu güne kadar meme kanseri oluşumu ve gelişiminden sorumlu olan genlerin araştırılması amacıyla pek çok mikrodizin çalışması yapılmış ve meme kanseri, patolojik sınıflandırmanın yanı sıra moleküler olarak da alt gruplara ayrılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların bulunması ve hücrede çok önemli işlevlere sahip olduklarının gösterilmesi bu molekülleri de meme kanseri oluşumunda ve gelişiminde rol alan şüpheliler listesine koymuştur ve mRNA ifade profilleri ile açıklanamayan farklılıklar miRNA çipleri ile araştırılmaya başlanmıştır. miRNA çipleri sayesinde meme kanserine sebep olabilecek hedef miRNA'lar bulunmaya başlanmıştır ancak bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (57, 60, 24, 62). Veritabanlarına yüklenmiş olan bağımsız miRNA verilerinden daha fazla bilgi sağlamak biyoinformatik yöntemlerle mümkün olmakta ve var olan veriyi değerli kılmaktadır.

Bu çalışmada amaçlanan;

- Literatürde şimdiye kadar meme kanseri ile ilgili yapılmış, ham ya da işlenmiş verisine ve klinik bilgilerine ulaşılabilen mikroRNA ifade mikrodizin verilerini halka açık veritabanlarından elde etmek (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, ArrayExpress; <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>)
- Verileri bir araya getirecek bir meta-analiz programı geliştirmek
- Meme kanserinin alt tiplerinde belirteç adayı mikroRNA'ları ortaya çıkartmak ve listelemek
- Elde edilen listelerdeki mikroRNA'ların hangi genleri hedeflediğini ve bu genlerin hangi yollarda yer aldığını bulmak
- Literatürde meme kanseri ile ilgili yapılmış mRNA mikrodizin çalışmalarının verilerini geliştirilen program ile analiz edip, elde edilen gen setlerinin, bulunan miRNA hedef genleriyle olan ilişkilendirmesini yapmaktır. (Meta-analiz sonrasında ortaya çıkacak olan miRNA hedef genlerinin, bağımsız mikrodizin çalışmaları ile olan alakasının araştırılması meme kanserinde miRNA-mRNA alakasının kurulması açısından önem taşımaktadır.)

- Belirteç adayı miRNA'ların (meta-miRNA) meme tümör dokularında eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (eş-zamanlı PZR) yöntemi ile doğrulanması da bu çalışmanın amaçları arasında yer almaktadır.

Daha önce meme kanserinde miRNA mikrodizin çalışmalarını bir araya getiren bir meta-analiz çalışması yapılmadığı için elde edilen sonuçlar mikroRNA'ların meme kanseri regülasyonundaki rolünü aydınlatmak için bir katkı olacaktır. Meta-analiz çalışması pek çok veriyi bir araya getirme şansı tanıdığı için, elde edilen sonuçlar yalnızca bir vakaya özel değildir ve daha genel bilgiyi yansıtmaktadır. Çıkan miRNA hedef genlerinin farklı mikrodizin çalışmaları ile onaylanması çalışmaya ayrı bir değer ve özgünlük katmış ve çıkan sonuçların doğruluğunu güçlendirmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Meme Kanseri miRNA Mikrodizin Çalışmaları

Çalışmada klinik bilgilerine ulaşılabilen 6 tane meme kanseri miRNA mikrodizin verisi kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Meta-analiz çalışması için kullanılan meme kanseri miRNA mikrodizin çalışmalarının erişim numarası, verilerin elde edildiği kaynak ve çalışmanın gerçekleştirildiği platform bilgileri.

ERİŞİM NUMARASI	KAYNAK	PLATFORM
GSE7842	GEO	Luminex Bead-based microRNA profiling platform version 3
GSE19783	GEO	Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B
GSE15885	GEO	Exiqon Homo sapiens 0.4K miChip v8
GSE20066	GEO	Exiqon Homo sapiens 0.4K miChip v8
GSE22216	GEO	Illumina Human v1 MicroRNA expression beadchip
GSE43040	GEO	Illumina Human v2 MicroRNA expression beadchip

Meta-analizde kullanılmak için seçilen 6 çalışmanın alt tip bilgilerine göre örnek sayıları belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Meta-analizde kullanılan miRNA çalışmalarının erişim numaraları ve alt tiplere göre belirlenmiş örnek sayıları.

ERİŞİM NUMARASI	ER		HER2		PR		TÜMÖR DERECESESİ			MOLEKÜLER ALT TİP				
	+	-	+	-	+	-	1	2	3	Bazal	Normal Benzeri	Her2+	Luminal A	Luminal B
GSE7842	60	33	-	-	-	-	20	34	39	16	6	5	15	9
GSE19783	61	38	17	75	-	-	-	-	-	15	10	17	41	12
GSE15885	16	13	5	24	20	9	5	7	17	5	-	4	19	1
GSE20066	-	-	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GSE22216	128	82	-	-	-	-	42	81	63	-	-	-	-	-
GSE43040	78	25	-	-	78	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam Örnek Sayısı	343	191	26	102	98	34	67	122	129	36	16	26	75	22

4.1.2. Meme Kanseri mRNA Mikrodizin Çalışmaları

Çalışmada klinik bilgilerine ulaşılabilen 3 tane meme kanseri mRNA mikrodizin verisi kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Meta-analiz çalışması için kullanılan meme kanseri mRNA mikrodizin çalışmalarının erişim numarası, verilerin elde edildiği kaynak ve çalışmanın gerçekleştirildiği platform bilgileri.

ERİŞİM NUMARASI	KAYNAK	PLATFORM
GSE23720	GEO	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
E-MTAB-1006	ArrayExpress	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array
GSE17907	GEO	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Meta-analizde kullanılmak için seçilen 3 çalışmanın alt tip bilgilerine göre örnek sayıları belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Meta-analizde kullanılan mRNA çalışmalarının erişim numaraları ve alt tiplere göre belirlenmiş örnek sayıları.

ERİŞİM NUMARASI	ER		HER2		PR		TÜMÖR DERECESİ			MOLEKÜLER ALT TİP				
	+	-	+	-	+	-	1	2	3	Bazal	Normal Benzeri	Her2+	Luminal A	Luminal B
GSE23720	131	66	-	-	118	79	-	-	-	-	-	-	-	-
E-MTAB-1006	67	29	22	74	42	54	18	34	44	-	-	-	-	-
GSE17907	22	25	33	4	19	28	3	10	34	1	4	35	8	-
Toplam Örnek Sayısı	220	120	55	78	179	161	21	44	78	-	-	-	-	-

4.1.3. Doku Örnekleri

Çalışmada 22 farklı hastaya ait meme tümör dokusu kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. Eş zamanlı PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) de kullanılan meme tümör dokularının tümör kodları ve klinik bilgileri. Tümör örneklerinin bu çalışmada kullanımı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Etik kurul raporu EK 4’te sunulmuştur.

Tümör Kodu	Tümör derecesi	ER	PR	HER2	Tümör Yüzdesi
MFT 014	-	1	1	-	%90
MFT 016	2	1	1	0	%100
MFT 021	3	0	0	0	%90
MFT 040	3	-	-	-	%100
MFT 041	2	0	1	1	%100
MFT 049	2	-	-	-	%100

MFT 078	2	-	-	-	%60					
MFT 085	2	0	1	1	%100					
MFT 088	2	1	1	0	%90					
MFT 094	3	0	0	0	%100					
MFT 095	3	-	-	0	%80					
MFT 096	1	0	1	0	%100					
MFT 097	2	-	-	-	%70-80					
MFT 113	1	1	0	1 Zayıf	%100					
MFT 115	3	-	-	-	%80					
MFT 116	1	0	0	1	%90					
MFT 120	2	-	-	-	%90					
MFT 124	1	1	0	1 Zayıf	%100					
MFT 127	2	0	0	-	%100					
MFT 129	2	0	0	0	%80					
MFT 131	2	0	0	1	%90					
MFT 132	3	0	0	1	%100					
	TD1	TD2	TD3	+	-	+	-	+	-	
Toplam Örnek Sayısı	4	11	6	5	10	6	9	7	7	

4.1.4. Kitler

- **miRNA Kitleri**

miScript II RT Kit (50), cDNA kiti ve miScript SYBR Green PCR Kit (200), eş zamanlı PZR kiti Qiagen firmasından temin edilmiştir.

- **mRNA Kitleri**

First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), cDNA kiti ve LightCycler® 480 SYBR Green I Master, eş zamanlı PZR kiti Roche firmasından temin edilmiştir.

4.1.5. Primerler

- miRNA Primerleri

Çizelge 4.6. Eş zamanlı PZR’de kullanılan primerlerin miRNA adı, sekans ve Qiagen ürün adı bilgileri.

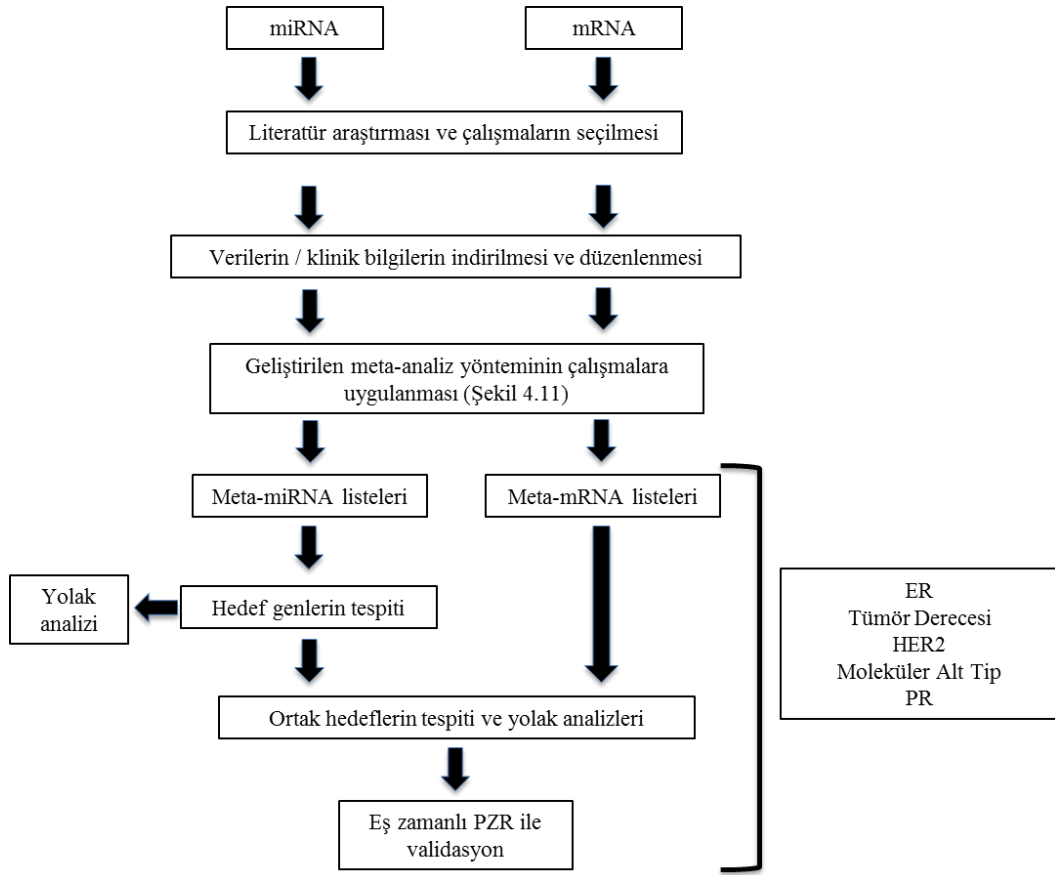
miRNA Adı	Qiagen Ürün Adı	Sekans (5'>3')
hsa-let-7a	Hs_let-7a_2 miScript Primer Assay	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7c	Hs_let-7c_1 miScript Primer Assay	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
hsa-let-7d	Hs_let-7d_1 miScript Primer Assay	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
hsa-let-7e	Hs_let-7e_3 miScript Primer Assay	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
hsa-let-7f	Hs_let-7f_1 miScript Primer Assay	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-let-7i	Hs_let-7i_1 miScript Primer Assay	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
hsa-miR-216	Hs_miR-216a_1 miScript Primer Assay	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA
hsa-miR-30a-3p	Hs_miR-30a*_1 miScript Primer Assay	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC
hsa-miR-30a-5p	Hs_miR-30a-5p_1 miScript Primer Assay	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG
hsa-miR-339	Hs_miR-339_1 miScript Primer Assay	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG
hsa-miR-501-3p	Hs_miR-501-3p_1 miScript Primer Assay	AAUGCACCCGGGCAAGGAUUCU
hsa-miR-505*	Hs_miR-505*_1 miScript Primer Assay	GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU
hsa-miR-516-3p	Hs_miR-516a-3p_1 miScript Primer Assay	UGCUUCCUUUCAGAGGGU
hsa-miR-518d-3p	Hs_miR-518d-3p_1 miScript Primer Assay	CAAAGCGCUUCCCUUGGAGC
hsa-miR-99b	Hs_miR-99b_2 miScript Primer Assay	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG

- mRNA Primerleri

Çizelge 4.7. Eş zamanlı PZR’de kullanılan primerlerin gen adı, forward (ileri) ve reverse (geri) sekans, ürün boyutu bilgileri.

Gen Adı	F/R	Ürün Boyutu	Sekans (5'>3')
TGFB1	F	181	GTACCTGAACCCGTGTTGCT
	R		CAACTCCGGTGACATCAAAA
RUNX1	F	187	CCACTCCACTGCCTTTAACC
	R		TTCTGCAGAGAGGGTTGTCA
VEGFA	F	168	GCCTCCGAAACCATGAACT
	R		GCAGTAGCTGCGCTGATAGA
IGF1R	F	236	ACTGTGGACTGGTCCCTGAT
	R		TGGCAGCACTCATTGTTCTC
STAT3	F	225	GAGGGAACAAGCCCCAAC
	R		CTCCAGGTACCGTGTGTCAA
TCF19	F	201	GGTGATGACTGGAGGGTCAG
	R		AGCAAAGTCCTGAGGCTTGA
NCAPG	F	246	TATTGGTGTGCCCTTTGTGA
	R		TCCTCCTTCTTCACTGGTATCC
ZEB2	F	184	GCCATCTGATCCGCTCTTAT
	R		GTTGGCAATACCGTCATCCT
XRN1	F	240	GCGAAGTGGTGAAAGAGCAT
	R		GCTGCTGGTTCATTTTTGCT
STMN1	F	218	AAGGATCTTTCCCTGGAGGA
	R		TGTGCCTCTCGGTTCTCTTT

4.2. Yöntem



Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması.

4.2.1. Literatür Araştırması

Literatür araştırması iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama çalışmanın başlamasından sonra dinamik bir şekilde devam etmiş olan meme kanseri miRNA mikrodizin verilerinin bulunmasını, ikinci aşama ise meta-analiz yöntemi ile bulunan miRNA'ların hedef genlerinin bağımsız çalışmalar ile alakasının araştırılması için meme kanseri mRNA mikrodizin verilerinin bulunmasını kapsamaktadır.

Birinci aşamada, literatürde şimdiye kadar meme kanseri ile ilgili yapılmış, meta-analizde kullanılabilir özelliklere sahip miRNA mikrodizin verilerini elde edebilmek amacı ile halka açık veri tabanları olan Gene Expression Omnibus; GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> ve ArrayExpress; <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> veri tabanlarından yararlanılmıştır. Bu veri tabanlarında arama yapılırken anahtar kelime olarak sırası ile “miRNA”, “microarray” ve “breast cancer” birlikte kullanılmıştır. Bahsedilen anahtar kelimelerin hepsine yanıt veren çalışmaların yayınları gözden

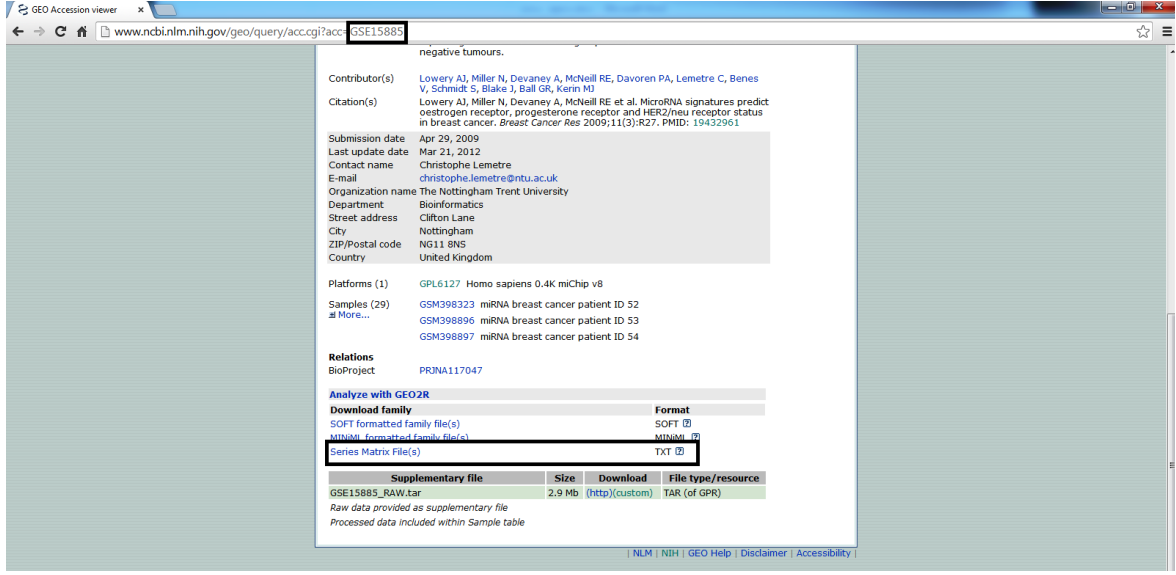
geçirilmiş ve bu çalışmaların bize seçim yapmak için kolaylık sağlayacağı düşünülen bazı özellikleri (platform tipi, örnek tipi ve sayısı, patoloji bilgileri, alt tip bilgileri) listelenmiş, verileri indirilmiş ve depolanmıştır. Meta-analiz çalışması meme dokuları ile yapılan çalışmaları içerecek şekilde tasarlandığı için formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş (FFPE) dokular ile ve kan ile yapılan çalışmalar elenmiştir. Bu işlem aralıklarla tekrarlanmış ve yeni eklenen çalışmalar takip edilmiş, uygun olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Kullanılan veri tabalarından ham veya işlenmiş verilere ulaşmanın yanı sıra deneylerde kullanılan örneklerin klinik özelliklerine ulaşmak da genellikle mümkün olmaktadır. Çalışmada hedeflenen miRNA imzalarının farklı histolojik ve/veya patolojik özelliklere göre araştırılabilmesi için verilerle birlikte klinik özelliklere ulaşılması önemlidir. Verilerle birlikte klinik özellikler de indirilmiş, düzenlenmiş (klinik özellik dosyalarında örneklerin isimlendirilme formatı veri dosyasından farklı olabilmektedir bu da analizde sorun yaratmaktadır) ve depolanmıştır. Çalışmalardan yayınları olanların yayınlarına PubMed yayın veri tabanı ve Google arama motorunun bir alt birimi olan ve her türlü yayın, tez ve veriye ulaşılabilen Google Scholar (Akademik Google) da kullanılarak ulaşılmıştır. Sonuç olarak klinik özelliklerine de ulaşılabilen 6 tane çalışmanın işlenmiş (normalize) verileri meta-analizde kullanılmak üzere seçilmiştir (Çizelge 4.1)

İkinci aşamada ise meta-analiz sonucu bulunan miRNA'ların hedef gen setlerinin bağımsız mRNA çalışmalarıyla ilişkilendirilmesinin yapılabilmesi için literatürde şimdiye kadar meme kanseri ile ilgili yapılmış, klinik özellikleri uygun mRNA mikrodizin verilerini bulmak amacıyla yine aynı veri tabalarından yararlanılmış ve arama yapılırken sırası ile “mRNA”, “microarray” ve “breast cancer” birlikte kullanılmıştır. Bahsedilen anahtar kelimelerin hepsine yanıt veren çalışmaların arasından meme tümör / normal dokuları ile yapılan ve miRNA çalışmaları ile paralel klinik bilgilerine erişilebilenler tercih edilmiştir. Çalışmalardan yayınları olanların yayınlarına yine PubMed yayın veri tabanı ve Google Scholar (Akademik Google) kullanılarak ulaşılmıştır. Sonuç olarak 3 tane çalışmanın işlenmiş verileri seçilmiştir (Çizelge 4.3)

4.2.2. Verilerin İndirilmesi ve Düzenlenmesi

Seçilen miRNA çalışmaları ve mRNA çalışmalarının işlenmiş verileri, Gene Expression Omnibus; GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> ve ArrayExpress; <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> veri tabanları kullanılarak indirilmiştir.

GEO veri tabanından işlenmiş verileri elde etmek için çalışmaların erişim numaraları ile arama yapıldıktan sonra “**series matrix**” dosyaları indirilmiş (Şekil 4.2) ve depolanmıştır.



Şekil 4.2. GEO veri tabanında GSE15885 erişim numaralı çalışma için işlenmiş verinin indirildiği sekmeyi gösteren ekran görüntüsü

ArrayExpress veri tabanından işlenmiş verileri elde etmek için çalışmaların erişim numaraları ile arama yapıldıktan sonra “**processed data**” dosyaları indirilmiş (Şekil 4.3) ve depolanmıştır.



Şekil 4.3. ArrayExpress veri tabanında E-MTAB-1006 erişim numaralı çalışma için işlenmiş verinin indirildiği sekmeyi gösteren ekran görüntüsü

İndirilen mikrodizin veri dosyalarında ilk sütunu miRNA ve mRNA kimlik numaraları oluşturmaktadır ve bu numaralar çalışmanın yapıldığı mikrodizin platformuna özgüdür, yani aynı miRNA ya da mRNA'nın platformlar arasında numaralandırması / isimlendirilmesi farklılık göstermektedir. Seçilen çalışmalar farklı platformlarda yapıldığı için meta-analiz yöntemi uygulanırken bu durumun sorun yaratmaması amacıyla kimlik numaraları karşılık geldikleri miRNA ve mRNA isimleriyle değiştirilmiştir. Sonuç olarak veri dosyaları ilk satırda örnek isimleri, ilk sütunda ise miRNA / mRNA isimlerinin olduğu son haline getirilmiş ve “.xlsx“ uzantılı Excel dosyaları haline getirilmiştir (Şekil 4.4).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
17	MIRNA	GSM398823	GSM398896	GSM398897	GSM398898	GSM398899	GSM398900	GSM398902	GSM398903	GSM398904	GSM398905	GSM398906	GSM398907	GSM398909	GSM398910
18	hsa-let-7a	0.494511053	0.022340323	-0.408135138	-0.390546225	-0.377455398	-0.332585323	-0.229254686	0.901049992	0.080451851	0.884485619	-0.121740956	0.572051771	0.769417545	0.551429482
19	hsa-let-7b	0	-1.67155987	-1.00697503	-0.833521606	-1.11628491	-0.762482636	-0.35893341	-0.873817111	-0.675940773	-0.810831828	-1.403380667	-1.36529714	-1.01657877	-1.01657877
20	hsa-let-7c	0	-1.87126669	-1.0434682	-1.1308302	-1.3507674	-1.33530319	-0.982838942	-0.645657409	-1.17594289	-0.715222906	-0.871362228	-1.5740008	-1.46629942	-1.09736021
21	hsa-let-7g	0.111439734	-1.56628438	-1.0668253	-1.18875816	-1.43343404	-1.07781507	-1.16569686	-0.73860825	-0.967724623	-0.426573354	-0.620327856	-1.47391906	-1.65125268	-1.12993482
22	hsa-let-7f	-0.010419661	-1.74564602	-0.60822647	-1.24621633	-1.26615933	-2.01048927	-1.24972319	-0.694420697	-1.07305659	-0.864328077	-1.1149718	-1.86467875	-1.69348469	-1.28523285
23	hsa-miR-1	-0.122147919	-1.25268131	-1.62685085	-1.25709423	-1.11645335	-0.815732167	2.68596009	-0.677209642	1.63490649	-1.43913936	-0.61646709	-0.72329501	-1.71632216	-1.28560387
24	hsa-miR-100	0.150379426	-1.26262689	0.059837458	-0.798808191	-0.992443801	-0.95643653	-1.30035468	-0.580844427	-1.43113536	0.410896219	-1.0048988	-1.23327007	-0.17566281	-0.27202869
25	hsa-miR-101	0	-0.2326647921	-0.100840688	1.93455839	1.89780968	0.51432384	0.888709555	-0.493384049	-0.557132599	-0.652667841	-0.338240749	0.33525426	0.06279908	0.96687102
26	hsa-miR-105	0	-0.23929517	0.413075983	0.20198621	0.02083314	0.140778566	0.113163351	0.183429266	-0.014646777	0.667424661	0.20898369	0.12998816	0.05889369	-0.002542195
27	hsa-miR-106a	-0.308129032	-0.248439593	-0.401574937	-0.017504913	-0.229914649	0.211707825	0.25525355	0.312415537	-0.005118151	0.054928691	0.20864346	-0.008167612	-0.23384137	0
28	hsa-miR-106b	-0.318045465	-0.169512757	-0.53002127	0.278449432	0.116369273	0.26036738	0.182432879	0.226957888	0.034776639	0.020071571	0.00388631	0.152547454	-0.096337921	-0.001934696
29	hsa-miR-107	-0.645487696	-0.044871931	-0.635763186	0.357750678	0.134203197	-0.176643753	0.047343451	-0.2008564	-0.042183559	-0.531316676	-0.22873724	0	-0.13408805	0.103215417
30	hsa-miR-104	-0.261228663	-1.33794363	0	-0.621361024	-0.358155354	-1.29648679	-1.3613347	-0.672717095	-1.45714887	-0.222039703	-0.957075269	-0.900748364	-0.06337921	-0.001934696
31	hsa-miR-102a	0	-1.4349964	0.121990524	-0.452411836	-0.284731706	-1.80445287	-0.728734466	-0.681524686	-1.26529131	-0.602902337	-0.75644795	-0.579344443	0.05260729	0.430413375
32	hsa-miR-122a	0	-0.896365416	-0.801766796	0.14892057	0.355199234	0.275116796	-0.715027787	0.063324658	-0.245833069	1.15560014	-0.412739756	0.689789887	-0.49875703	0.238144027
33	hsa-miR-124a	0.486987341	0	-0.187391939	0.168122759	0.306357138	0.302005637	-0.720678077	0.797073401	-0.52232641	1.97455575	-0.285287212	1.52660499	0.417432015	1.02303754
34	hsa-miR-125a	1.55307578	0.007095877	0.273235363	0.144817033	0.129876023	0.535997325	-0.048032309	1.0410602	0.903825614	1.65030222	-0.352100741	-0.702501245	-0.58648278	-0.509649681
35	hsa-miR-125b	0.5584004	-0.805129482	-0.182300894	-0.353526313	-0.706750205	0	-0.536493165	0.583294564	0.263765044	0.875072786	-0.543654355	-0.885079089	-0.736550272	-0.864949681
36	hsa-miR-126*	0	-0.790768536	0.449107317	1.62209097	0.925196764	-0.540256047	-0.612293227	-0.605975505	-1.33475926	-0.411186572	-0.787379335	-0.524114586	-0.403964712	-0.959847132
37	hsa-miR-127	-0.103411515	1.9303492	2.07811512	1.59677138	1.34624392	1.76911967	1.84687132	1.04845507	1.39813609	0.810274892	1.79100407	0.882528182	1.31956532	1.5418059
38	hsa-miR-128a	0	0	0	-0.055334548	-0.279889218	-0.654319771	-0.282958316	0	-0.435728599	0	-0.799081941	-0.876045007	0	-0.568193444
39	hsa-miR-128b	0	-0.499926396	-0.456447759	0.305626285	-0.175221214	-0.084888897	-0.160296298	0.129079552	0	-0.013922373	-0.216678766	-0.584706816	0	-0.268851732
40	hsa-miR-129	0.684048539	-0.129252184	-0.158932544	0.22778053	-0.268799375	0.639948893	-0.386088833	0.352448005	-0.344724971	1.52796603	-0.339656524	0.897518547	0.168876632	0.218519974
41	hsa-miR-130a	0.054480168	-0.374176941	-0.780358189	-0.268100829	-0.345469095	0.050912394	0.269476507	0.770527511	0.610830482	0.522106404	-0.072434959	-0.384761306	-0.417275971	-0.26416804
42	hsa-miR-130b	0.72553179	-0.239642369	-0.453076916	0	-0.368585015	0.142101922	0.211194466	0.297109793	0.572332119	0.604858929	1.24280761	-0.28115766	0	0.125203047
43	hsa-miR-132	0	0	0	0.74091544	0.055781452	0.24326746	-0.161344331	-0.674999842	0.044765015	0.723347467	-0.112474727	0.146975343	0	0.045206674
44	hsa-miR-133a	1.15223939	0.951905044	-0.115763282	-0.365514675	-0.636253479	0.196901891	1.4542731	1.24899575	1.36340455	0.471740745	-0.067359818	-0.152942244	0.293638931	0
45	hsa-miR-133b	1.15223939	0.951905044	-0.115763282	-0.365514675	-0.636253479	0.196901891	1.4542731	1.24899575	1.36340455	0.471740745	-0.067359818	-0.152942244	0.293638931	0
46	hsa-miR-133b	1.50252685	0.692349044	0.11832696	-0.044289679	-0.029179683	0.232321382	1.99848435	0.675910027	1.64817445	0.644154544	-0.019293577	-0.139776267	0.420216498	-0.099393334
47	hsa-miR-134	1.71819703	-0.07889552	0.346548405	-1.19689447	-0.101084955	-0.04583389	-0.866108739	0.657792034	-0.092792938	1.11785364	-0.471413554	-0.100471924	-0.68990646	-0.516281903
48	hsa-miR-135b	0	0.798710368	0.318299364	0	0.004579322	-0.352547336	2.41014508	0.451102564	1.85834945	0	1.73111426	-0.29137339	0	-0.041745473

Şekil 4.4. GSE15885 erişim numaralı çalışmaya ait veri dosyasının meta-analiz programında kullanılmak üzere düzenlenmiş şeklini gösteren ekran görüntüsü. İlk satır örnek isimlerini, ilk sütun ise miRNA isimlerini temsil etmektedir.

4.2.3. Klinik Bilgilerin İndirilmesi ve Düzenlenmesi

Seçilen miRNA çalışmaları ve mRNA çalışmalarının klinik bilgileri, Gene Expression Omnibus; GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> ve ArrayExpress; <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> veri tabanlarından ya da yayının ek dosyalarından alınmış ve depolanmıştır.

Accession	Age	Tumour size	Grade	Uicc stage	Er	Pr	Her2/neu	Subtype
GSM398323	49 years	23mm		1 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398896	52 years	30mm		3 2A	Negative	Negative	Positive	Her2 Overexpressing
GSM398897	57 years	45mm		3 2A	Negative	Negative	Positive	Her2 Overexpressing
GSM398898	51 years	21mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398899	68 years	15mm		3 1	Positive	Negative	Negative	Luminal A
GSM398900	42 years	22mm		3 2A	Negative	Negative	Negative	triple-negative
GSM398902	54 years	26mm		3 2A	Negative	Positive	Negative	Luminal A
GSM398903	35 years	22mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398904	50 years	16mm		3 1	Negative	Negative	Negative	triple-negative
GSM398905	49 years	25mm		2 2A	Negative	Negative	Negative	triple-negative
GSM398906	59 years	20mm		3 1	Negative	Positive	Negative	Luminal A
GSM398907	58 years	22mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398909	58 years	18mm		1 1	Negative	Positive	Positive	Her2 Overexpressing
GSM398910	66 years	22mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398911	56 years	17mm		1 1	Negative	Negative	Negative	triple-negative
GSM398912	48 years	30mm		3 2A	Negative	Negative	Positive	Her2 Overexpressing
GSM398913	60 years	26mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398914	56 years	29mm		2 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398915	50 years	3mm		2 1	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398916	40 years	7mm		1 1	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398917	40 years	6mm		2 1	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398918	58 years	35mm		2 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398919	64 years	34mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398921	66 years	26mm		1 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398922	84 years	16mm		2 1	Negative	Positive	Negative	Luminal A
GSM398923	57 years	7mm		3 1	Negative	Positive	Negative	Luminal A
GSM398924	68 years	35mm		3 2A	Positive	Positive	Negative	Luminal A
GSM398926	40 years	20mm		2 1	Positive	Positive	Positive	Luminal B
GSM398927	49 years	35mm		3 2A	Negative	Negative	Negative	triple-negative

Şekil 4.5. GSE15885 erişim numaralı çalışmaya ait klinik bilgi dosyasını gösteren ekran görüntüsü.

Klinik bilgi dosyaları meta-analiz programında çalıştırılırken hızlı sonuç alınması için negatiflere 0, pozitiflere 1, alt tip çeşitlerine ise 1den 5e kadar numara verilmiş ve .xls uzantılı Excel dosyaları haline getirilmiştir (Şekil 4.6).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1		GSM398323	GSM398896	GSM398897	GSM398898	GSM398899	GSM398900	GSM398902	GSM398903	GSM398904	GSM398905	GSM398906	GSM398907	GSM398909	GSM398910
2	ER	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
3	GRADE	1	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	1	3
4	HER2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	SUBTYPE	4	3	3	4	4	1	4	4	1	1	4	4	3	4
6	PR	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1

Şekil 4.6. GSE15885 erişim numaralı çalışmaya ait klinik bilgi dosyasının meta-analiz programında kullanılmak üzere düzenlenmiş şeklini gösteren ekran görüntüsü. İlk satır örnek isimlerini, ilk sütün ise alt tip çeşidini temsil etmektedir.

4.2.4. Meta-analiz Programının Geliştirilmesi

Meta-analiz programının geliştirilmesi verilerin şekillenmesiyle başlayan ve çalışma boyunca devam eden bir süreç olmuştur. Mikrodizin verileri indirilmeye, depolanmaya ve düzenlenmeye başlandıktan sonra örnek sayıları, platform tipleri vb. özellikleri belirlenmiştir. Veriler indirilirken normalize edilmiş halleri tercih edilmiştir, normalizasyon işlemi her ne kadar çipler arasındaki farkı ortadan kaldırsa da farklı platformlardan gelen verilerin bir araya konması için platformlar arası farklılıkları ortadan kaldıracak ya da platform farklılıklarından etkilenmeyecek bir meta-analiz yöntemine ihtiyaç duyulmuştur. Farklı çalışmalardan elde edilen verileri bir araya getirmek ve ifade farklılığı gösteren miRNA'lara ve mRNA'lara ulaşmak için gerekli istatistiksel yöntemleri de içeren bir meta-analiz yazılım çalışması planlanmıştır. Eşzamanlı olarak literatürde geçen meta-analiz yaklaşımları da değerlendirilmiştir.

Program ANOVA temelli ve sıralama tabanlı bir yaklaşımla geliştirilmiştir. İki'den fazla grubun ortalamaları arasındaki farkı sınavan bir istatistiksel test olan one-way ANOVA'yı farklı özelliklere sahip çalışmalardan alınan verilere uygulayarak, sonucunda elde edilen anlamlılık değerlerine göre bir sıralama yapmaktadır. ANOVA testi, her bir çalışma için önceden belirlenen *östrojen reseptörü (ER)*, *progesteron reseptörü (PR)* ve *HER2 reseptör tipleri, tümör dereceleri* ve *moleküler alt tiplere* göre uygulanmaktadır. Test sonucunda her çalışma için p değerleri küçükten büyüğe sıralanmış miRNA listeleri oluşturulmaktadır. Alt tipler için, miRNA'ların her bir çalışmadaki sırası tespit edilmektedir (Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Bütün çalışmalardaki sıralamaların ortalama değeri o miRNA'nın farklılık derecesini işaret etmektedir ve *sonuç sıralama değerini* belirleyerek sonuç dosyasına atanmaktadır (Şekil 4.10).

miRNA	p değeri	Çalışmadaki Sıralaması
hsa-miR-296	0.0019453	1
hsa-miR-100	0.0021116	2
hsa-miR-501	0.003335	3
hsa-let-7c	0.004992	4
hsa-miR-154	0.0076761	5
hsa-let-7g	0.007932	6
hsa-let-7b	0.0080566	7
hsa-miR-519b	0.008515	8
hsa-let-7i	0.0090065	9
hsa-miR-329	0.0092506	10
hsa-miR-10a	0.0097407	11
hsa-miR-213	0.010523	12
hsa-miR-106b	0.012342	13
hsa-miR-30c	0.013341	14
hsa-let-7a	0.013516	15
hsa-miR-151	0.014719	16
hsa-miR-141	0.015939	17
hsa-miR-302c*	0.016758	18
hsa-miR-125b	0.019242	19
hsa-miR-515-3p	0.020745	20

Şekil 4.7. hsa-let-7c'nin GSE15885 erişim numaralı çalışmadaki sıralamasını gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü.

miRNA	p değeri	Çalışmadaki Sıralaması
hsa-let-7f	0.19009	1
hsa-let-7e	0.21216	2
hsa-let-7g	0.22724	3
hsa-let-7i	0.24401	4
hsa-let-7d	0.41029	5
hsa-let-7a	0.47338	6
hsa-miR-552	0.66472	7
hsa-miR-559	0.66474	8
hsa-miR-553	0.66495	9
hsa-miR-551b	0.66716	10
hsa-miR-560	0.6673	11
hsa-let-7c	0.66808	12
hsa-miR-554	0.66955	13
hsa-miR-556-5p	0.66955	14
hsa-miR-555	0.66996	15
hsa-miR-566	0.67003	16
hsa-miR-557	0.67012	17
hsa-miR-561	0.67041	18
hsa-miR-567	0.67084	19
hsa-miR-629*	0.67175	20

Şekil 4.8. hsa-let-7c'nin GSE22216 erişim numaralı çalışmadaki sıralamasını gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü.

miRNA	p değeri	Çalışmadaki Sıralaması
hsa-miR-130a	2.95E-06	1
hsa-miR-106b	2.96E-06	2
hsa-miR-25	8.24E-06	3
hsa-miR-93	8.80E-06	4
hsa-miR-214	1.27E-05	5
hsa-miR-199a*	1.55E-05	6
hsa-miR-106a	2.07E-05	7
hsa-miR-199b	3.16E-05	8
hsa-miR-18a	4.80E-05	9
hsa-miR-99a	6.80E-05	10
hsa-let-7c	0.00015086	11
hsa-miR-199a	0.00022658	12
hsa-miR-17-5p	0.00026245	13
hsa-miR-100	0.00028694	14
hsa-let-7a	0.00051827	15
hsa-miR-19a	0.00094671	16
hsa-miR-7	0.0014612	17
hsa-miR-15b	0.0016504	18
hsa-let-7b	0.001736	19
hsa-miR-30a-3p	0.0023291	20

Şekil 4.9. hsa-let-7c'nin GSE7842 erişim numaralı çalışmadaki sıralamasını gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü.

Böylece hsa-let-7c örneği için bulunduğu 3 çalışmadaki sıralamasının ortalaması alınarak *sonuç sıralama değeri* olan 9 bulunmuştur.

hsa-let-7c için sıralamaların ortalaması;

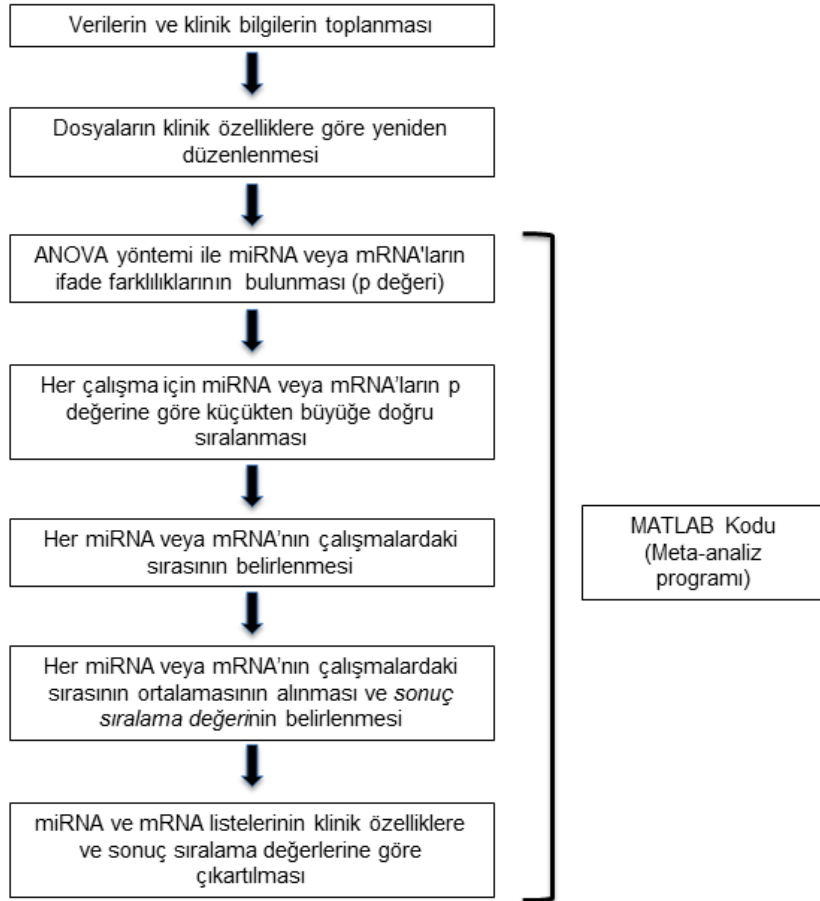
$$\frac{4+12+11}{3}=9$$

miRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
hsa-let-7c	9.0	3	1
hsa-let-7a	12.0	3	2
hsa-let-7f	14.5	2	3
hsa-let-7d	15.5	2	4
hsa-let-7e	19.0	2	5
hsa-let-7i	23.7	3	6
hsa-miR-30a-3p	26.0	2	7
hsa-let-7g	31.3	3	8
hsa-miR-331	53.5	2	9
hsa-miR-199b	55.5	2	10
hsa-let-7b	71.0	3	11
hsa-miR-199a	71.5	2	12
hsa-miR-30a-5p	73.0	2	13
hsa-miR-509	75.0	2	14
hsa-miR-7	85.5	2	15
hsa-miR-320	86.5	2	16
hsa-miR-33	90.0	2	17
hsa-miR-28	91.5	2	18
hsa-miR-99a	91.5	2	19
hsa-miR-122a	92.5	2	20

Şekil 4.10. En küçük sıralama ortalamasının sonuç sıralama değerine göre ilk sırada olduğunu gösteren örnek listeye ait ekran görüntüsü.

Programın temel mantığı, ANOVA sonucu elde edilen p değerleri küçükten büyüğe sıralandığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede ve yüksek farklılık gösteren miRNA'ların üst sıralarda olacağı ve bu nedenle sıralamaların ortalaması alındığında bu miRNA'lar için elde edilen değerlerin diğerlerine göre küçük olacağı üzerine kuruludur (Şekil 4.11).

Program MATLAB programlama dili kullanılarak yazılmıştır ve programın diğer araştırmacıların da kullanımına sunulmak üzere erişime açılabilmesi için çalışmalar sürmektedir (kod EK1' de verilmiştir).



Şekil 4.11. Meta-analiz yönteminin iş akış şeması. Aynı algoritma hem miRNA hem de mRNA çalışmaları için kullanılmıştır.

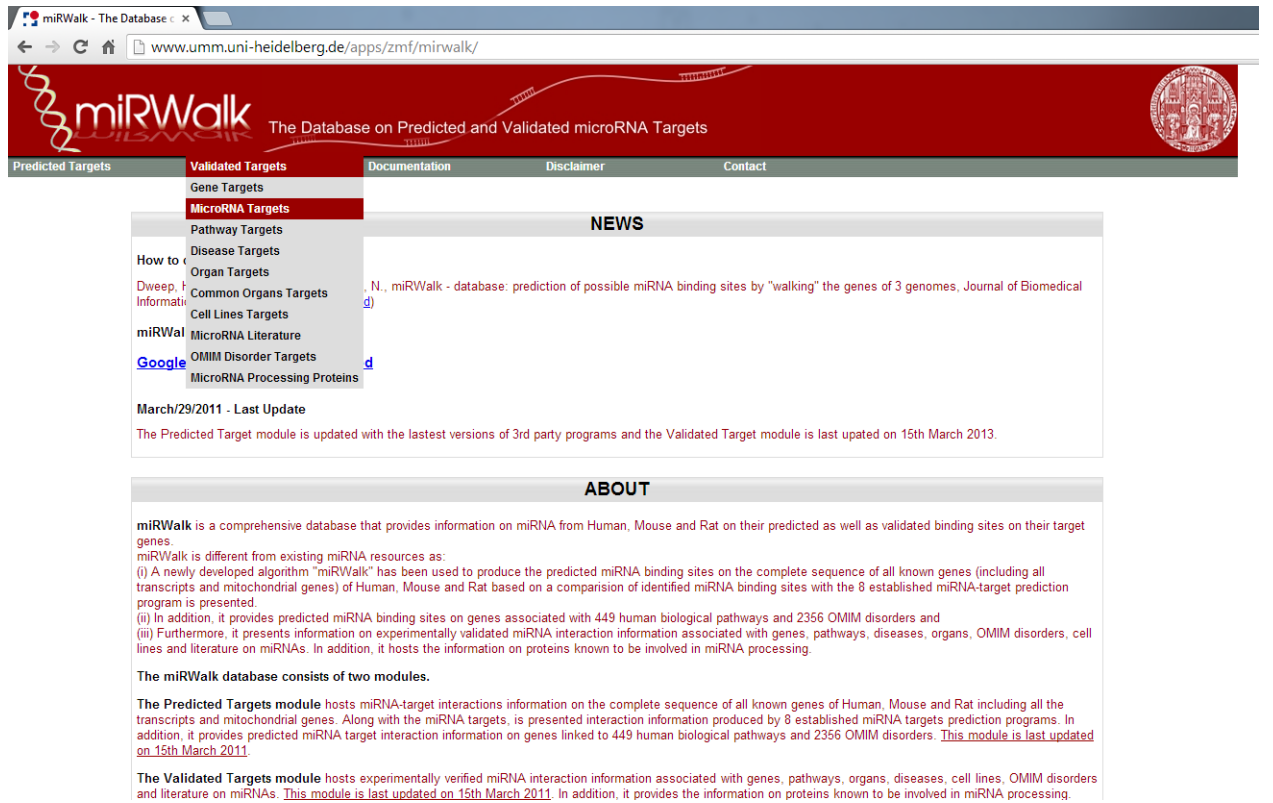
4.2.5. Geliştirilen Meta-Analiz Yönteminin Seçilen miRNA Çalışmalarına Uygulanması

MATLAB programlama dili kullanılarak geliştirilen ANOVA temelli, sıralama tabanlı meta-analiz programı 6 çalışmayı (Çizelge 4.1) kapsayacak şekilde çalıştırılmıştır. Bu altı çalışmadaki miRNA'lar her çalışma için, ER, PR, HER2, tümör derecesi ve moleküler alt tip için uygulanmış olan ANOVA testi sonucu elde edilen p değerine göre küçükten büyüğe sıralanmıştır (Bu listeler ara dosyalar olarak program tarafından verilmektedir). Son aşamada program en az iki çalışmada ortak olarak görülen miRNA'ların p değerine göre sıralamalarını belirleyip bu sıralamaların ortalamasını almış ve bu ortalamaları küçükten büyüğe dizerek bir *sonuç sıralama değeri* belirlemiştir. Örnek olarak ER(+) / ER(-) bilgisi olan tüm çalışmalardaki miRNA'ların (ER bilgisi olan en az iki tane veri dosyasında bulunan) sonuç sıralama değerlerine göre bir listesi olmuştur. Bu listeleme işlemi her bir patolojik ve histolojik durum için tekrarlanmış ve sonuçta ER, PR, HER2,

tümör derecesi ve moleküler alt tipleri için belirteç adayı meta-miRNA'ların üst sıralarda olduğunu düşündüğümüz listeler elde edilmiştir (tam listeler ekli CD'dedir).

4.2.6. Belirteç Adayı miRNA'ların (meta-miRNA) Hedef Genlerinin Bulunması ve miRNA Hedef Genlerine Yolak Analizlerinin Uygulanması

miRNA hedef genlerinin bulunması için pek çok biyoinformatik araç bulunmaktadır. Bu çalışmada özellikle deneysel olarak onaylanmış miRNA hedeflerinin ayrıca belirtildiği miRWalk (82) sitesinden faydalanılmıştır.



The screenshot shows the miRWalk website interface. The browser address bar displays 'www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/'. The website header includes the miRWalk logo and the tagline 'The Database on Predicted and Validated microRNA Targets'. A navigation menu at the top lists 'Predicted Targets', 'Validated Targets', 'Documentation', 'Disclaimer', and 'Contact'. The 'Validated Targets' menu is expanded, showing sub-categories like 'Gene Targets', 'MicroRNA Targets', 'Pathway Targets', 'Disease Targets', 'Organ Targets', 'Common Organs Targets', 'Cell Lines Targets', 'miRNA Literature', 'OMIM Disorder Targets', and 'MicroRNA Processing Proteins'. The main content area features a 'NEWS' section with a date 'March/29/2011 - Last Update' and a paragraph stating: 'The Predicted Target module is updated with the latest versions of 3rd party programs and the Validated Target module is last updated on 15th March 2013.' Below this is an 'ABOUT' section that describes the database's scope and provides details about the 'Predicted Targets' and 'Validated Targets' modules, including their update dates.

Şekil 4.12. miRWalk sitesinden deneysel olarak onaylanmış miRNA hedeflerinin alınmasını gösteren ekran görüntüsü.



MicroRNA Target Results						
Bottom Paging View						
MicroRNA Name	StemLoopName	miR_Ch.	Gene Name	EntrezID	Pubmed ID	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	RAB5C	5878	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	ARID1A	8289	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	MRC2	9902	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	CID	10438	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	HMGA2	8091	20652617	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	FNDC3A	22862	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	IGF2R	3482	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	PODXL	5420	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	NQS1	4842	21134262	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	PPP5C	5536	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	TPM3	7170	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	P4HA2	8974	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	GEMIN5	25929	11914277	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	MAP3K12	7786	19851984	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	THEM1	117145	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	GARS	2617	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	NARS	4677	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	AURKB	9212	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	DICER1	23405	16674096	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	MT4	84560	20353094	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	CSNK1D	1453	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	ARL10	285598	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	TMED7	51014	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	NIN	64359	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	FAM96A	84191	18668040	
hsa-miR-30a*	hsa-mir-30a	6	EIF2C2	27161	19138993	

Şekil 4.13. miRWalk sitesinde ER belirteç adayı olan hsa-miR-30a-3p (hsa-miR-30a*) için deneysel olarak onaylanmış hedef listesini gösteren ekran görüntüsü.

Geliştirilen program sıralama tabanlı olduğu için belirteç adayı miRNA'lar seçilirken tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6, ER, PR, HER2 ve moleküler alt tip için ise ilk 3 miRNA üzerinden çalışılmış ve bu miRNA'ların ortak hedef genleri tespit edilmiştir. Bu liste elde edilirken ortak elemanların venn şemaları yardımıyla bulunmasını sağlayan ve tekrarlı elemanları eleyen bir araç olan Venny (83) kullanılmıştır.

Ayrıca ortak hedef gen listeleri yolak analiz araçlarında analiz edilerek biyolojik işlevleri, moleküler fonksiyonları ve buldukları yolaklar araştırılmıştır. Yolak analizi için, WebGestalt, (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>), GeneCodis (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>) ve KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>) yolak analiz araçları kullanılmıştır.

4.2.7. Geliştirilen Meta-Analiz Yönteminin Bağımsız mRNA Çalışmalarına Uygulanması

miRNA verilerine uygulanan meta-analiz yönteminin aynı şekilde mRNA verilerine de uygulanması miRNA-mRNA ilişkisinin araştırılabilmesi açısından önemlidir.

Bu nedenle program seçilen 3 çalışmayı (Çizelge 4.3) kapsayacak şekilde tekrar çalıştırılmıştır. Üç çalışmadaki mRNA'lar her çalışma için, ER, PR, HER2, tümör derecesi ve moleküler alt tip için uygulanmış olan ANOVA testi sonucu elde edilen p değerine göre küçükten büyüğe doğru sıralanmıştır (Bu listeler ara dosyalar olarak program tarafından verilmektedir). Son aşamada program en az iki çalışmada ortak olarak görülen mRNA'ların p değerine göre sıralamalarını belirleyip bu sıralamaların ortalamasını almış ve bu ortalamaları küçükten büyüğe dizerek bir *sonuç sıralama değeri* belirlemiştir. Örnek olarak ER(+)/ER(-) bilgisi olan tüm çalışmalardaki mRNA'ların (ER bilgisi de olan en az iki tane veri dosyasında bulunan) sonuç sıralama değerlerine göre bir listesi olmuştur. Bu listeleme işlemi her bir patolojik ve histolojik durum için tekrarlanmış ve sonuçta ER, PR, HER2, tümör derecesi için meta-mRNA'ların üst sıralarda olduğunu düşündüğümüz listeler elde edilmiştir (tam listeler ekli CD'dedir).

Sadece bir mRNA mikrodizin çalışmasında (GSE17907) bilgisinin olması sebebi ile moleküler alt tip için program tarafından sonuç listesi oluşturulmamıştır.

4.2.8. miRNA Hedef Gen Listelerinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listeleri ile Karşılaştırılması

Belirteç adayı olduğu düşünülen miRNA'ların (ER, HER2 ve PR için sıralamadaki ilk 3 içerisinde, tümör derecesi için ise ilk 6 miRNA) hedef genlerinden yalnızca *deneysel olarak onaylananların* tamamı ile mRNA çalışmalarının meta-analizinden çıkan gen listesinin sıralamaya göre ilk %20'sinin ortak elemanları bulunmuş ve yüzdeleri hesaplanmıştır. Bunun için yine ortak elemanların venn şemaları yardımıyla bulunmasını sağlayan ve tekrarlı elemanları eleyen bir araç olan Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) kullanılmıştır. Venny biyoinformatik aracının tekrarları elemesi sağlıklı bir yüzde bulunması açısından önemlidir.

4.2.9. Ortak Gen Listelerine Yolak Analizlerinin Uygulanması

Bulunan ortak hedef genler yolak analiz araçlarında analiz edilerek biyolojik işlevleri, moleküler fonksiyonları ve buldukları yolaklar araştırılmıştır. Yolak analizi için, WebGestalt, WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>), GeneCodis (<http://genecodis.dacya.ucm.es/>) ve KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.jp/kegg/>) yolak analiz araçları kullanılmıştır.

4.2.10. Belirteç Adayı miRNA'ların İfade Farklılığının Tümör Meme Dokusu Örneklerinde Eş-Zamanlı PZR Yöntemi ile Araştırılması

Çalışmanın bu kısmı total RNA izolasyonu, miRNA'lardan cDNA sentezi ve eş zamanlı PZR'yi içeren 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

ER ve HER2 statüleri için *sonuç sıralama değerine* göre ilk 5 ve tümör derecesi için ise ilk 6 miRNA'nın primerleri temin edilmiş ve eş-zamanlı PZR'de kullanılmıştır (Çizelge 4.6).

Meme tümörlerinden elde edilmiş RNA örnekleri Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Işık Yuluğ'dan temin edilmiştir.

RNA örnekleri hem miRNA hem de mRNA çalışmaları için kullanılmıştır.

miRNA'lardan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Total RNA kullanılarak yapılan cDNA sentez reaksiyonlarında mRNA'yı total RNA'dan ayırmak için mRNA'nın 3' ucunda bulunan polyA kuyruğu kullanılır ve oligoT primeri polyA kuyruğuna hedef olarak kullanılarak total RNA'nın içinde bulunan mRNA'dan tamamlayıcı DNA sentezlenir. Olgun miRNA'ların 3' uçlarında polyA kuyruğu bulunmamaktadır ve bu durum klasik bir cDNA sentezinin yapılmasını engellemektedir. miRNA'lardan cDNA sentezi için öncelikle miRNA'ların 3' uçlarına polyA kuyruğunu da içeren bir "universal tag" eklenmiştir (Qiagen). Bu ek hem cDNA sentezi için kullanılacak primer dizisini içermekte (polyA) hem de miRNA'nın boyunu eş zamanlı PZR için yeterli uzunluğa getirmektedir. Bir sonraki basamakta universal tag'e spesifik bir primer kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Belirteç adayı miRNA'ların ifade farklılığının eş zamanlı PZR yöntemi ile araştırılması

İfade farklılıkları gösteren miRNA'ların doğrulama çalışması eş zamanlı PZR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her bir meme tümöründen elde edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmış ve PZR sonucunda elde edilecek ifadeler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. miRNA'lara özel ileri primerler (Çizelge 4.6) cDNA sentezi kitlerine de uyumlu olarak Qiagen firmasından sağlanmıştır. Geri primer olarak cDNA sentez reaksiyonunda da primer olarak kullanılan *universal tag*'e tamamlayıcı olan *universal primer* kullanılmıştır Qiagen firmasından satın alınan bu kitler laboratuvarımızda bulunan Roche LightCycler 480 platformu ile uyumludur. miRNA ifadelerinin analizleri için RNU6-2 normalizasyon geni olarak kullanılmıştır ve sonuçların analizi $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.11. Seçilen mRNA'ların İfade Farklılığının Tümör Meme Dokusu Örneklerinde Eş-Zamanlı PZR Yöntemi ile Araştırılması

Çalışmanın bu kısmı mRNA'lardan cDNA sentezi ve eş zamanlı PZR'yi içeren 2 aşamada gerçekleştirilmiştir.

Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın deneysel olarak onaylanmış hedefleri ile mRNA listesinin (meta-analiz sonucu elde edilen) ilk %20'sinin ortağı olan 49 genin (Çizelge 5.17) 10 tanesine Primer3 (84) programı kullanılarak primer tasarlanmış, primerler temin edilmiş ve eş-zamanlı PZR'de kullanılmıştır (Çizelge 4.7).

mRNA'lardan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

mRNA'dan cDNA sentezi klasik yöntem olan oligo(dT) primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Roche).

Seçilen mRNA'ların ifade farklılığının eş zamanlı PZR yöntemi ile araştırılması

mRNA'ların doğrulama çalışması eş zamanlı PZR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her bir meme tümöründen elde edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmış ve gen spesifik primerler (Çizelge 4.7) kullanılarak PZR reaksiyonu kurulmuştur. PZR sonucunda elde edilecek ifadeler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. mRNA ifade analizleri için ACTB ve TBP normalizasyon geni olarak kullanılmıştır ve sonuçların analizi $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.12. Seçilen meta-mRNA'ların Biyoinformatik Olarak Onaylanması

Tümör derecesi için ilk 6 meta-miRNA'nın deneysel olarak onaylanmış hedefleri ile meta-mRNA listesinin (meta-analiz sonucu elde edilen) ilk %20'sinin ortağı olan 49 genin (Çizelge 5.17) tamamı ile BRB-Array Tools kullanılarak bağımsız çalışmalarda analiz yapılmıştır.

BRB-Array Tools, DNA mikrodizin verilerini görünür hale getiren ve istatistiksel yöntemlerle işlemeye yarayan Excel tabanında çalışan bir eklenti paketidir. Bu analiz aracının özellikleri kullanarak seçtiğimiz gen listesinin bağımsız çalışmalarda nasıl ifade gösterdiği ve tumor derecesi için ayırıcı olup olmadığı incelenmiştir.

4.2.13. İstatistiksel Analizler

4.2.13.1. ANOVA Testi

ANOVA testi iki ya da daha fazla gruba ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını belirlemek için kullanılır. Çalışmada, meta-analiz algoritması içinde kullanılan ANOVA testi MATLAB kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.13.2. t-Testi

t-testi, hipotez testlerinde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu test ile iki grubun ortalamaları karşılaştırılarak, aradaki farkın rastlantısal mı, yoksa istatistiksel olarak anlamlı mı olduğuna karar verilir. Çalışmada t-testi, eş-zamanlı PZR sonucunda ifade farklılığı gösteren miRNA ve mRNA'ların tespiti sırasında Excel'deki "TTEST" fonksiyonu kullanılarak uygulanmıştır.

4.2.13.3. Kümeleme Analizi (Cluster Analysis)

Birimleri sahip oldukları karakteristik özelliklere göre gruplayan istatistiksel analiz yöntemidir. Kümeleme işlemi başarılı olursa, bir geometrik çizim yapıldığında nesnelere küme içerisinde birbirine çok yakın, kümeler ise birbirinden uzak ve ayrı olacaktır. Kümeleme analizi ve görselleştirmesi için Eisen Lab Cluster Version 3.0 ve Treeview Version 1.1.6 R4 programları kullanılmıştır (85).

4.2.13.4. Ayırma Analizi (Discriminant Function Analysis)

Ayırma analizi, iki veya daha fazla sayıdaki grubun ayırımı ile ilgilenen bir istatistiksel analizdir. Bu yöntemle analiz öncesi tanımlanmış iki veya daha fazla sayıda grubun ortalama nitelikleri arasında önemli farkların olup olmadığının test edilebilir, gruplar arasındaki farka her bir değişkenin katkısının bulunabilir ve gruplar arasındaki ayırımı en iyi yapan değişken kombinasyonunu belirlenebilir. Ayırma analizleri Minitab™ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.13.5. Mann Whitney Testi

Mann Whitney testi iki grubun birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir (86). Grupların ortanca (medyan) değerlerini karşılaştırır, değişkenlerin değerlerini sıralı hale dönüştürür. Böylece iki grup arasındaki sıralamanın farklı olup olmadığını değerlendirir. Çalışmada Mann Whitney Testi Minitab™ programı kullanılarak yapılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Meta-analiz Sonucu Elde Edilen Belirteç Adayı meta-miRNA Listeleri

Geliştirilen ANOVA temelli ve sıralama tabanlı meta-analiz programının 6 meme kanseri, miRNA mikrodizin çalışması (Çizelge 4.1) için çalıştırılması sonucu elde edilen listede *sonuç sıralama değerine* göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar ER, Tümör Derecesi, HER2, moleküler alt tip ve PR için aşağıda verilmiştir (tam listeler ekli CD’dedir).

5.1.1. ER Statüsü İçin Belirteç Adayı meta-miRNA Listesi

Çizelge 5.1. ER için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar.

miRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
hsa-miR-30a-3p	28.0	2	1
hsa-miR-505*	31.5	2	2
hsa-miR-30a-5p	45.5	2	3
hsa-miR-518d-3p	47.0	2	4
hsa-miR-501-3p	53.0	2	5
hsa-miR-449b	53.3	3	6
hsa-miR-491-5p	54.0	3	7
hsa-let-7a	57.4	5	8
hsa-miR-452	57.8	4	9
hsa-miR-518f	58.5	2	10
hsa-miR-877	59.0	2	11
hsa-miR-199b	60.5	2	12
hsa-miR-339	63.5	2	13
hsa-miR-93	65.3	4	14
hsa-miR-661	67.0	2	15
hsa-miR-33	68.0	2	16
hsa-miR-122a	68.5	2	17
hsa-miR-199a*	68.8	4	18
hsa-miR-518a-3p	70.0	2	19
hsa-miR-199a	72.0	2	20

5.1.2. Tümör Derecesi (Grade) İçin Belirteç Adayı meta-miRNA Listesi

Çizelge 5.2. Tümör derecesi için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar.

miRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
hsa-let-7c	9.0	3	1
hsa-let-7a	12.0	3	2
hsa-let-7f	14.5	2	3
hsa-let-7d	15.5	2	4
hsa-let-7e	19.0	2	5
hsa-let-7i	23.7	3	6
hsa-miR-30a-3p	26.0	2	7
hsa-let-7g	31.3	3	8
hsa-miR-331	53.5	2	9
hsa-miR-199b	55.5	2	10
hsa-let-7b	71.0	3	11
hsa-miR-199a	71.5	2	12
hsa-miR-30a-5p	73.0	2	13
hsa-miR-509	75.0	2	14
hsa-miR-7	85.5	2	15
hsa-miR-320	86.5	2	16
hsa-miR-33	90.0	2	17
hsa-miR-28	91.5	2	18
hsa-miR-99a	91.5	2	19
hsa-miR-122a	92.5	2	20

5.1.3. HER2 Statüsü İçin Belirteç Adayı meta-miRNA Listesi

Çizelge 5.3. HER2 için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar.

miRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
hsa-miR-30a-3p	6.0	2	1
hsa-miR-99b	10.0	2	2
hsa-miR-339	29.5	2	3
hsa-miR-516-3p	31.0	2	4
hsa-miR-216	32.0	2	5
hsa-miR-1	36.0	3	6
hsa-miR-302c	36.5	2	7
hsa-miR-217	38.0	2	8
hsa-miR-507	45.0	2	9
hsa-miR-412	49.0	2	10
hsa-miR-127	54.5	2	11
hsa-miR-337	54.5	2	12
hsa-miR-9	56.0	2	13
hsa-miR-383	58.5	2	14
hsa-miR-128b	59.0	2	15
hsa-miR-325	59.5	2	16
hsa-let-7a	63.7	3	17
hsa-miR-380-3p	65.0	2	18
hsa-miR-34c	65.5	2	19
hsa-miR-125a	67.0	2	20

5.1.4. Moleküler Alt Tip İçin Belirteç Adayı meta-miRNA Listesi

Çizelge 5.4. Moleküler alt tip için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar.

miRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
hsa-let-7a	16.7	3	1
hsa-miR-497	26.7	3	2
hsa-miR-493	27.0	2	3
hsa-miR-505	28.3	3	4
hsa-miR-494	29.5	2	5
hsa-miR-339	33.0	2	6
hsa-miR-422a	33.5	2	7
hsa-miR-378	35.5	2	8
hsa-miR-377	36.0	2	9
hsa-miR-500	38.0	2	10
hsa-miR-379	41.0	2	11
hsa-miR-451	41.3	3	12
hsa-miR-429	42.0	2	13
hsa-miR-128b	50.5	2	14
hsa-miR-382	50.5	2	15
hsa-miR-375	51.5	2	16
hsa-miR-498	52.0	2	17
hsa-miR-122a	55.0	2	18
hsa-miR-151	55.5	2	19
hsa-miR-125a	56.5	2	20

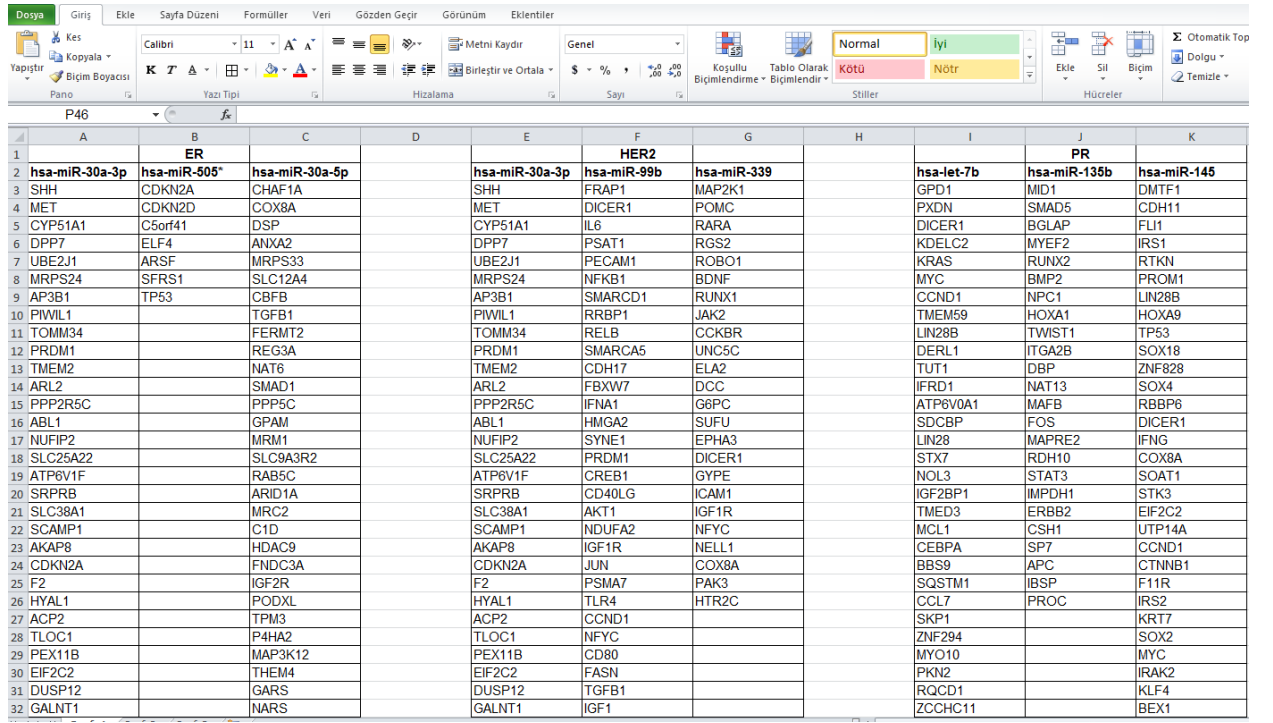
5.1.5. PR Statüsü İçin Belirteç Adayı meta-miRNA Listesi

Çizelge 5.5. PR için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan belirteç adayı meta-miRNA’lar.

miRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
hsa-let-7b	6.5	2	1
hsa-miR-135b	35	2	2
hsa-miR-145	37	2	3
hsa-miR-519a	39.5	2	4
hsa-miR-299-3p	40	2	5
hsa-miR-505	48.5	2	6
hsa-miR-224	56	2	7
hsa-let-7a	69	2	8
hsa-miR-222	73	2	9
hsa-miR-25	74.5	2	10
hsa-miR-29c	81.5	2	11
hsa-miR-34a	82	2	12
hsa-miR-378	85	2	13
hsa-miR-26a	91.5	2	14
hsa-miR-452	92.5	2	15
hsa-miR-29a	105	2	16
hsa-miR-199a*	106	2	17
hsa-miR-29b	114	2	18
hsa-miR-125b	115.5	2	19
hsa-miR-149	117	2	20

5.2. Belirteç Adayı miRNA'ların Hedef Genlerinin Bulunması ve Ortak Genlerin Yolak Analizi Sonuçları

Seçilen miRNA'ların *deneysel olarak onaylanan* hedef genleri miRWalk ile tespit edilmiş ve bu miRNA'ların etkilediği ortak hedefler Venny yardımı ile belirlenmiş, WebGestalt ve KEGG siteleri kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1		ER			HER2					PR	
2	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-505*	hsa-miR-30a-5p		hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-99b	hsa-miR-339		hsa-let-7b	hsa-miR-135b	hsa-miR-145
3	SHH	CDKN2A	CHAF1A		SHH	FRAP1	MAP2K1		GPD1	MID1	DMTF1
4	MET	CDKN2D	COX8A		MET	DICER1	POIC		PXDN	SMAD5	CDH11
5	CYP51A1	C5orf41	DSP		CYP51A1	IL6	RARA		DICER1	BGLAP	FLI1
6	DPP7	ELF4	ANXA2		DPP7	PSAT1	RGS2		KDEL2	MYEF2	IRS1
7	UBE2J1	ARF	MRPS33		UBE2J1	PECAM1	ROBO1		KRAS	RUNX2	RTKN
8	MRPS24	SFRS1	SLC12A4		MRPS24	NFKB1	BDNF		MYC	BMP2	PROM1
9	AP3B1	TP53	CBFB		AP3B1	SMARCD1	RUNX1		CCND1	NPC1	LIN28B
10	PIWIL1		TGFB1		PIWIL1	RRBP1	JAK2		TMEM59	HOXA1	HOXA9
11	TOMM34		FERMT2		TOMM34	RELB	CCKBR		LIN28B	TWIST1	TP53
12	PRDM1		REG3A		PRDM1	SMARCA5	UNC5C		DERL1	ITGA2B	SOX18
13	TMEM2		NAT6		TMEM2	CDH17	ELA2		TUT1	DBP	ZNF828
14	ARL2		SMAD1		ARL2	FBXW7	DCC		IFRD1	NAT13	SOX4
15	PPP2R5C		PPP5C		PPP2R5C	IFNA1	G6PC		ATP6V0A1	MAFB	RBBP6
16	ABL1		GPAM		ABL1	HMG2	SUFU		SDCBP	FOS	DICER1
17	NUFIP2		MRM1		NUFIP2	SYNE1	EPHA3		LIN28	MAPRE2	IFNG
18	SLC25A22		SLC9A3R2		SLC25A22	PRDM1	DICER1		STX7	RDH10	COX8A
19	ATP6V1F		RAB5C		ATP6V1F	CREB1	GYPE		NOL3	STAT3	SOAT1
20	SRPRB		ARID1A		SRPRB	CD40LG	ICAM1		IGF2BP1	IMPDH1	STK3
21	SLC38A1		MRC2		SLC38A1	AKT1	IGF1R		TMED3	ERBB2	EIF2C2
22	SCAMP1		C1D		SCAMP1	NDUFA2	NFYC		MCL1	CSH1	UTP14A
23	AKAP8		HDAC9		AKAP8	IGF1R	NELL1		CEBPA	SP7	CCND1
24	CDKN2A		FNDC3A		CDKN2A	JUN	COX8A		BBS9	APC	CTNNB1
25	F2		IGF2R		F2	PSMA7	PAK3		SQSTM1	IBSP	F11R
26	HYAL1		PODXL		HYAL1	TLR4	HTR2C		CCL7	PROC	IRS2
27	ACP2		TPM3		ACP2	CCND1			SKP1		KRT7
28	TLOC1		P4HA2		TLOC1	NFYC			ZNF294		SOX2
29	PEX11B		MAP3K12		PEX11B	CD80			MYO10		MYC
30	EIF2C2		THEM4		EIF2C2	FASN			PKN2		IRAK2
31	DUSP12		GARS		DUSP12	TGFB1			RQCD1		KLF4
32	GALNT1		NARS		GALNT1	IGF1			ZCCHC11		BEX1

Şekil 5.1. Bazı belirteç adayı miRNA'lar (ER,HER2 ve PR için sıralamada ilk 3 miRNA) için düzenlenmiş örnek hedef gen listesine ait ekran görüntüsü.

Yolak analizleri ER, HER2 ve PR için ilk 3 miRNA'nın ortak hedefi olan genler ile gerçekleştirilmiştir.

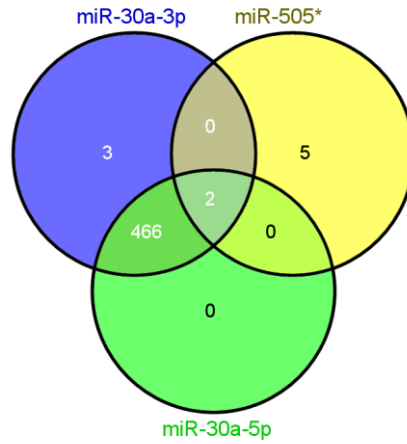
Moleküler alt tip için ilk 3 miRNA'nın ortak hedefi bulunmadığı için listeler birleştirilmiş ve yolak analizi bütün hedefler üzerinden yapılmıştır.

Tümör derecesinde ise ilk 6 miRNA'yı anlamlı olabilecek şekilde let-7 ailesine dahil miRNA'lar (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7i) oluşturduğu için ilk 6 miRNA'nın ortak hedefleri ile gerçekleştirilmiştir.

5.2.1. ER Statüsü için Belirteç Adayı miRNA'ların Hedef Genlerinin Bulunması ve Ortak Genlerin Yolak Analizi Sonuçları

ER için *sonuç sıralama değerine* göre ilk sırada olan hsa-miR-30a-3p'nin 471 tane, ikinci sıradaki hsa-miR-505*'in 7 tane, üçüncü sıradaki hsa-miR-30a-5p'nin ise 468 tane deneysel olarak onaylanmış hedefi bulunmaktadır.

Ortak hedefler Venny kullanılarak araştırılmış ve 2 gen ilk 3 miRNA için ortak çıkmıştır (Şekil 5.2). Bu genler; **CDKN2A** ve **TP53**'tür.



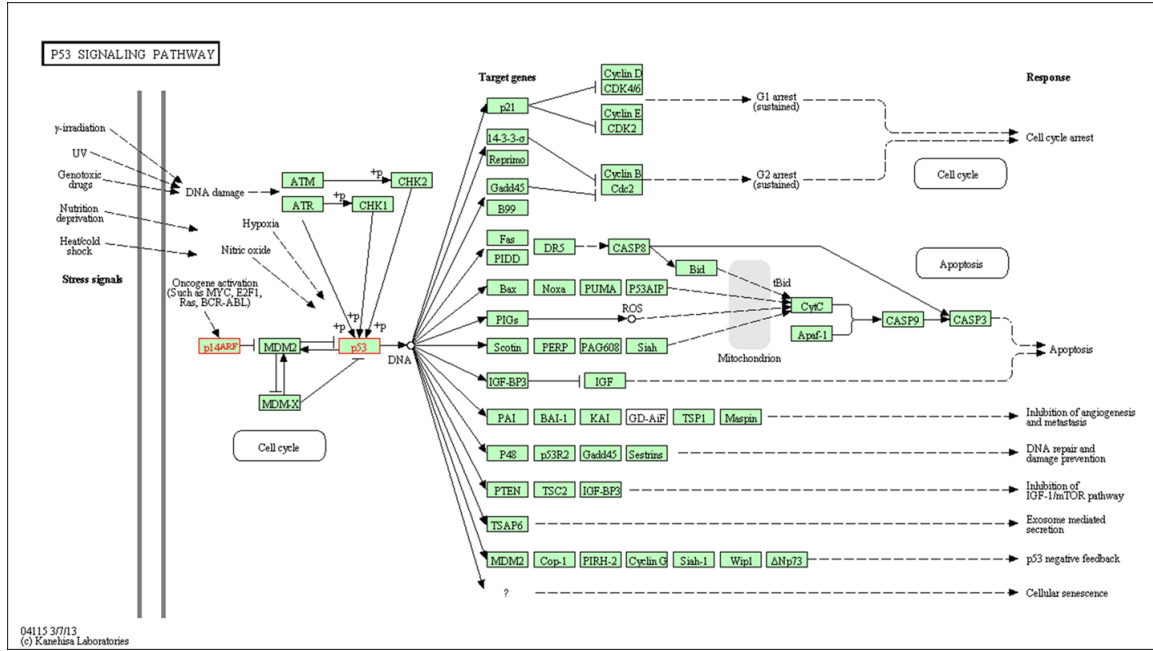
Şekil 5.2. ER patolojik alt tipi için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın ortak hedef gen sayısını gösteren Venny aracı ile çizilmiş venn şeması.

Yolak analizi için Webgestalt kullanılmıştır ve ER için ortak hedef genler olan CDKN2A (p14ARF) ve TP53 istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre döngüsü, kanser ve p53 sinyal yolağında (Şekil 5.3) yer almaktadır ($p \leq 5.70e-05$).

Çizelge 5.6. ER için ilk 3 miRNA'nın ortak hedefleri olan CDKN2A ve TP53'ün KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Pancreatic cancer	2	$p=3.64e-06$
Chronic myeloid leukemia	2	$p=3.64e-06$
Melanoma	2	$p=3.64e-06$
Glioma	2	$p=3.64e-06$
Non-small cell lung cancer	2	$p=3.64e-06$

p53 signaling pathway	2	p=3.64e-06
Bladder cancer	2	p=3.64e-06
Cell cycle	2	p=9.23e-06
Pathways in cancer	2	p=5.70e-05



Şekil 5.3. ER için ilk 3 miRNA'nın ortak hedef genleri olan CDKN2A ve TP53'ün KEGG yolak analiz sonucu (p=3.64e-06). Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.2.2. Tümör Derecesi için Belirteç Adayı miRNA'ların Hedef Genlerinin Bulunması ve Ortak Genlerin Yolak Analizi Sonuçları

Tümör derecesi için sonuç sıralama değerine göre elde edilen listede ilk 6 miRNA'yı anlamlı olabilecek şekilde let-7 ailesine dahil miRNA'lar (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7i) oluşturduğu için 6 miRNA'nın da deneysel olarak onaylanmış hedefleri belirlenmiştir. Sırasıyla hsa-let-7c'nin 299, hsa-let-7a'nın 308, hsa-let-7f'nin 283, hsa-let-7d'nin 283, hsa-let-7e'nin 301, hsa-let-7i'nin ise 269 tane hedefi bulunmuştur.

Ortak hedefler Venny kullanılarak araştırılmış ve 251 gen ilk 6 miRNA için ortak çıkmıştır (Çizelge 5.7).

Çizelge 5.7. Tümör derecesi için sonuç sıralama değerine göre ilk 6 miRNA'nın ortak hedef gen listesi.

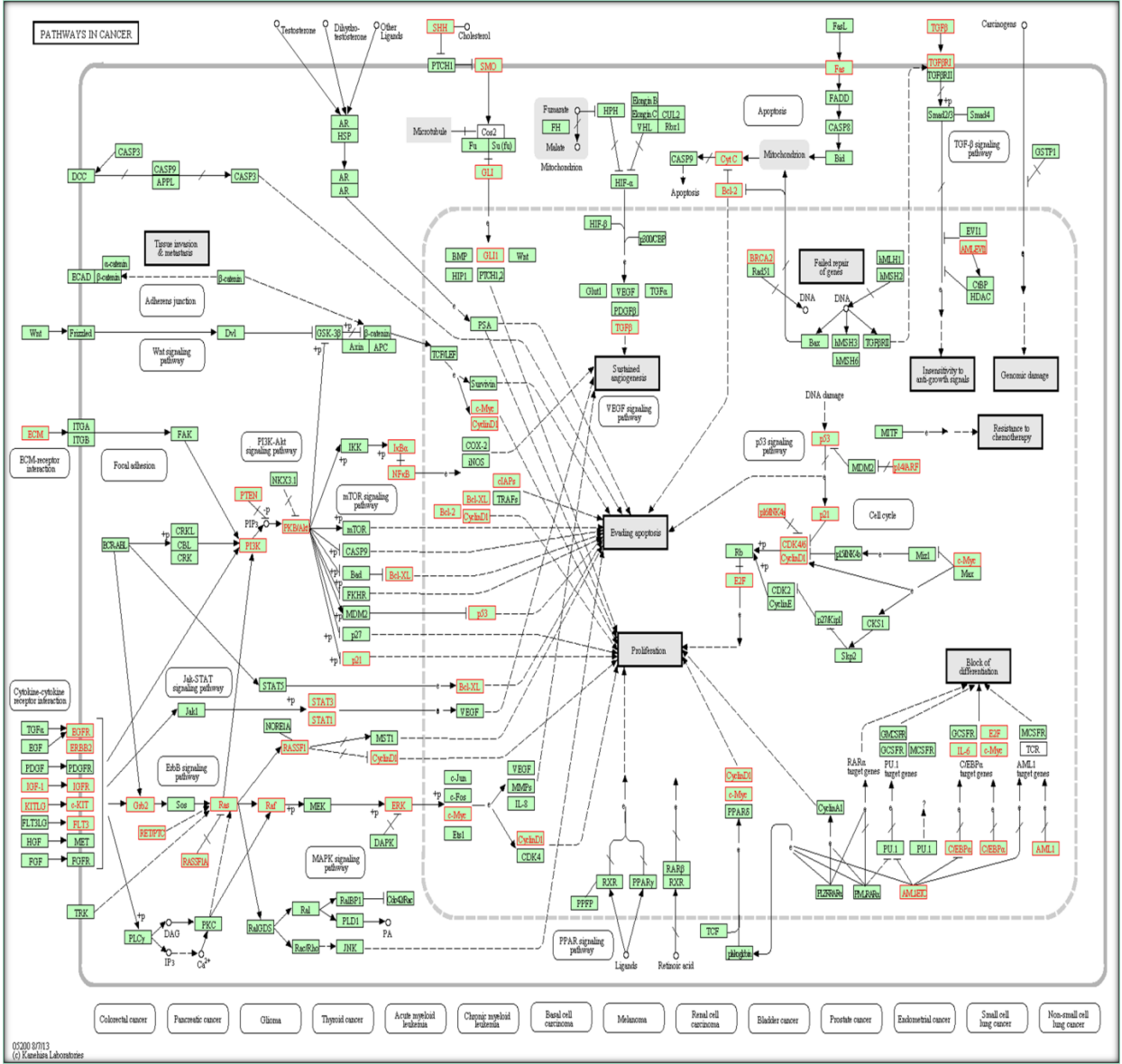
Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın ortak hedefleri				
ACVR2A	COPS8	GHR	NCOA3	SOCS1
AIRE	COX8A	GLI1	NCOA4	SOCS3
AKT1	CSAD	GPI	NES	SOCS4
AKT2	CSN1S1	GRB2	NFKB1	SOX2
ALDH1A1	CTNNBIP1	HAND1	NFKBIA	SPRY2
AMACR	CXCR4	HAND2	NKX2-1	SRC
ARC	CYCS	HDAC4	NOL3	SRM
ARS2	CYFIP2	HK1	NPAT	STAT1
ATN1	CYLD	HMGA1	NPC1	STAT3
ATP6V1B2	CYP27B1	HMGA2	NPM1	SYNE1
ATP8A2	DCN	HNF4A	NR1H2	TAF1C
BASP1	DDX6	HNRNPA1	NRAS	TARBP2
BBS9	DERL1	HOXA10	NRIP1	TBX5
BCL2	DGCR8	IFI44	OPRM1	TCF19
BCL2L1	DICER1	IFNA1	PAK3	TGFB1
BCL6	DNMT1	IFNA2	PAX7	TGFB3
BIRC3	DNMT3B	IFNG	PDCD6	TGFBR1
BRAF	DUSP2	IGF1	PDHA2	TIMP3
BRCA1	DYRK2	IGF1R	PGC	TM9SF3
BRCA2	E2F1	IGF2BP1	PGRMC1	TMEM132D
C17orf91	E2F2	IL10	PI3	TNF
CBS	E2F3	IL13	PIK3CA	TNRC6A
CCL7	ECD	IL6	PLOD3	TNRC6B
CCNA2	EGFR	IL8RA	POLD3	TNRC6C
CCND1	EGR1	ITGB3	POLR2A	TP53
CCND2	EIF2C1	JARID1B	PPARGC1A	TP63
CCNG1	EIF2C2	KHSRP	PRDM1	TP73
CCR4	EIF2C4	KISS1R	PROM1	TRAT1
CD4	EIF3A	KIT	PRTN3	TREH

CD46	EIF4E	KITLG	PSD4	TRIM17
CDC25A	EIF4G1	KRAS	PTEN	TRIM32
CDC25C	ELF4	LAMP3	RABEPK	TUT1
CDC34	ELK3	LARP4	RASSF1	TWIST1
CDK6	ELSPBP1	LIF	RBBP6	UBE2I
CDKN1A	EPHA2	LIN28	RBPJL	UHRF2
CDKN2A	EPHB2	LIN28B	RDX	VDR
CDKN2D	ERBB2	LRRK2	RET	WEE1
CEBPA	ERBB3	LSM1	RNASEN	WFS1
CEBPZ	ESR1	MAPK3	RORA	WIBG
CGA	ESR2	MBL2	RTN4	XPO1
CHAF1A	EXOSC1	MCL1	RUNX1	XRN1
CHEK1	FAS	MEIS1	SCPEP1	ZCCHC11
CISH	FASN	MEST	SF4	ZCCHC6
CKAP4	FBXW7	MMP14	SHH	ZEB1
CLEC5A	FLT3	MMP8	SKP1	ZNF167
CLU	FMR1	MOV10	SLC25A10	ZNF362
CNN3	FN1	MSTN	SLC27A4	ZNF512B
CNTN3	FOXA1	MYC	SLC7A1	
COL1A1	FOXP1	MYCN	SLC7A5	
COL4A2	FXR1	NCAPG	SMO	
COL5A3	GAB2	NCBP1	SMOX	

Yolak analizi için Webgestalt kullanılmıştır ve tümör derecesinde ilk 6 miRNA'nın hedef genleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde kanser (Şekil 5.4), apoptoz, hücre döngüsü ve JAK/STAT gibi sinyal yollarında yer almaktadır ($p \leq 4.50e-13$).

Çizelge 5.8. Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın ortak 251 hedefi için KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Pathways in cancer	49	$p=7.73e-53$
Chronic myeloid leukemia	25	$p=1.98e-36$
Pancreatic cancer	23	$p=3.90e-33$
Prostate cancer	22	$p=1.16e-28$
Non-small cell lung cancer	18	$p=2.94e-26$
Jak-STAT signaling pathway	23	$p=8.92e-25$
Small cell lung cancer	19	$p=3.89e-24$
Bladder cancer	15	$p=1.28e-22$
Acute myeloid leukemia	16	$p=3.36e-22$
Cell cycle	19	$p=5.97e-21$
ErbB signaling pathway	15	$p=1.42e-17$
p53 signaling pathway	13	$p=5.85e-16$
Apoptosis	12	$p=4.50e-13$
MAPK signaling pathway	17	$p=1.30e-12$
TGF-beta signaling pathway	10	$p=1.79e-10$

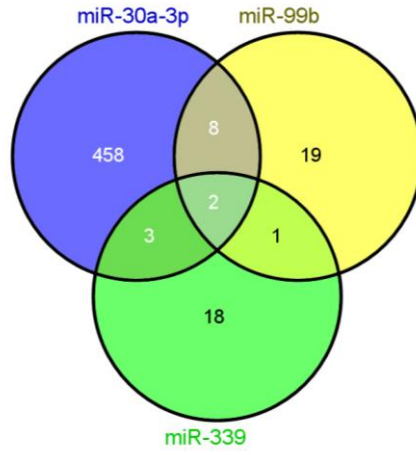


Şekil 5.4. Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın ortak hedef genlerinin 49 tanesinin KEGG yolak analiz sonucu ($p=7.73e-53$). Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.2.3. HER2 Statüsü için Belirteç Adayı miRNA'ların Hedef Genlerinin Bulunması ve Ortak Genlerin Yolak Analizi Sonuçları

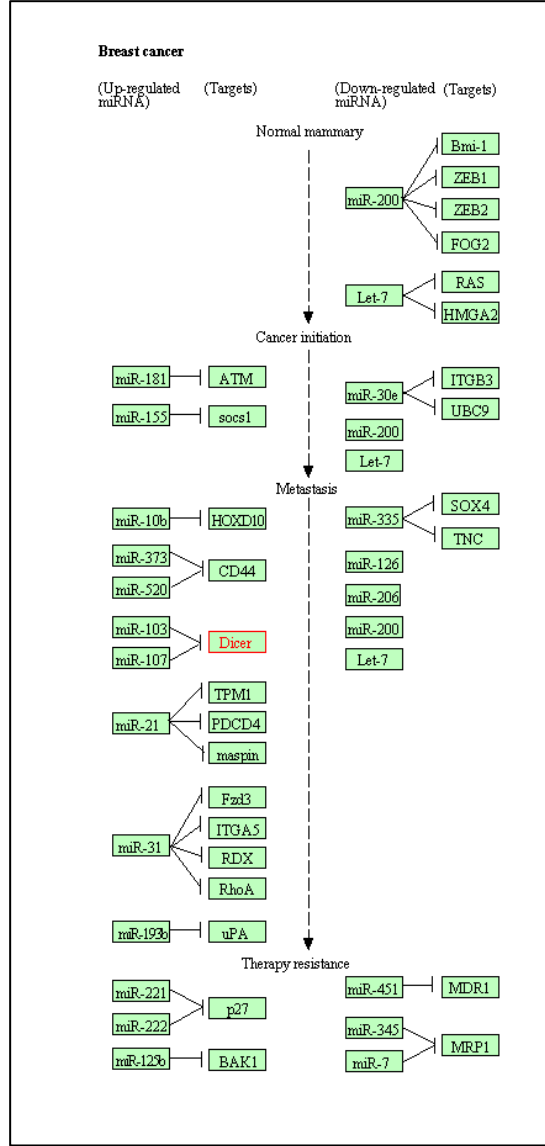
HER2 için sonuç sıralama değerine göre ilk sırada olan hsa-miR-30a-3p'nin 471 tane, ikinci sıradaki hsa-miR-99b'nin 30 tane, üçüncü sıradaki hsa-miR-339'un ise 24 tane deneysel olarak onaylanmış hedefi bulunmaktadır.

Ortak hedefler Venny kullanılarak araştırılmış ve 2 gen ilk 3 miRNA için ortak çıkmıştır (Şekil 5.5). Bu genler; **DICER1** ve **NFYC**'dir.



Şekil 5.5. HER2 patolojik alt tipi için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın ortak hedef gen sayısını gösteren Venny aracı ile çizilmiş venn şeması.

Yolak analizi için genler ortak bir yolakta bulunmadığı ve az sayıda gen araştırıldığı için Webgestalt üzerinden arama yapılmamış direk KEGG sitesi kullanılmıştır.



Şekil 5.6. HER2 için ilk 3 miRNA'nın ortak hedef genlerinden DICER1 için KEGG yolak analiz sonucu. Hedef gen kırmızı ile gösterilmektedir.

5.2.4. Moleküler Alt Tip için Belirteç Adayı miRNA'ların Hedef Genlerinin Bulunması ve Bu Genlerin Yolak Analizi Sonuçları

Moleküler alt tip için *sonuç sıralama değerine* göre ilk sırada olan hsa-let-7a'nın 308 tane, ikinci sıradaki hsa-miR-497'nin 23 tane, üçüncü sıradaki hsa-miR-493'ün ise 4 tane deneysel olarak onaylanmış hedefi bulunmaktadır. İlk 3 miRNA'nın ortak hedefi bulunmadığı için listeler birleştirilmiş ve yolak analizi bütün hedefler üzerinden yapılmıştır. Toplam hedef sayısı 322'dir (Çizelge 5.9).

Çizelge 5.9. Moleküler alt tip için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın toplam hedef gen listesi.

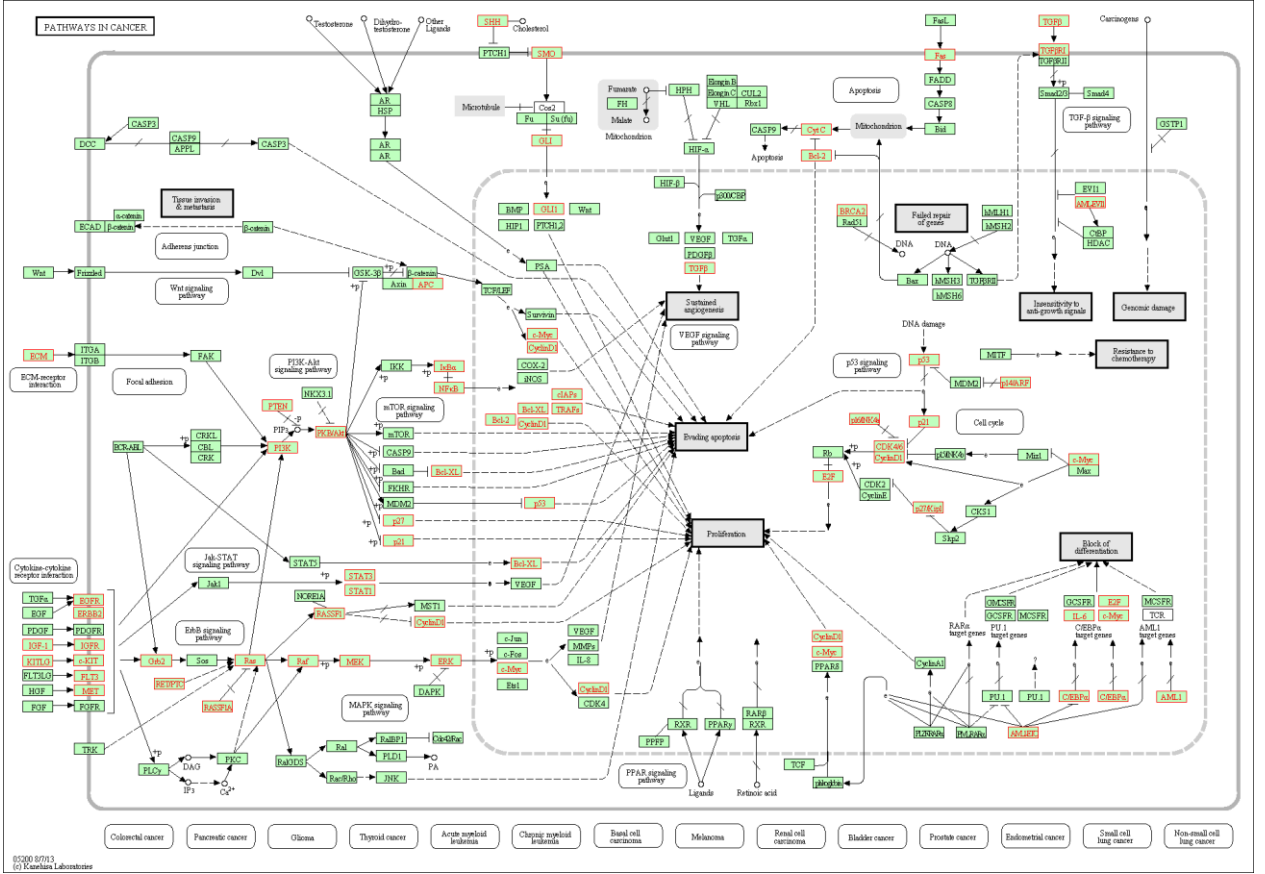
Moleküler alt tip için ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri					
ACVR2A	CLEC5A	ESR2	KITLG	PEBP1	SOCS4
AIRE	CLU	EXOSC1	KLF4	PGC	SOX2
AKT1	CNN3	F3	KRAS	PGRMC1	SPINK1
AKT2	CNTN3	FAS	LAMP3	PI3	SPRY2
ALDH1A1	COL1A1	FASN	LARP4	PIK3CA	SRC
AMACR	COL4A2	FBXW7	LGALS3	PLOD3	SRM
APC	COL5A3	FLT3	LIF	POLD3	STAT1
APOBEC3G	COPS8	FMR1	LIN28	POLR2A	STAT3
ARC	COX8A	FN1	LIN28B	POMC	STMN1
ARS2	CSAD	FOXA1	LRRK2	PPARGC1A	SYCP3
ASAH1	CSN1S1	FOXP1	LSM1	PPP2R1B	SYNE1
ATN1	CTNNBIP1	FOXP3	LYPLA3	PRDM1	TAF1C
ATP6V1B2	CXCL12	FXR1	MAP2K1	PROM1	TARBP2
ATP8A2	CXCR4	GAB2	MAPK1	PRTN3	TBX5
BACE1	CYB5R3	GEMIN4	MAPK3	PSD4	TCF19
BASP1	CYCS	GHR	MBL2	PTEN	TGFB1
BBS9	CYFIP2	GLI1	MCL1	RAB27A	TGFB3
BCL2	CYLD	GPI	ME1	RAB40B	TGFBR1
BCL2L1	CYP11A1	GRB2	MEIS1	RAB40C	TIMP3
BCL6	CYP19A1	HAND1	MEST	RABEPK	TLR4
BIRC3	CYP27B1	HAND2	MET	RAD51L3	TM9SF3
BRAF	CYP7A1	HDAC4	MMP14	RAF1	TMEM132D
BRCA1	DCN	HK1	MMP8	RASSF1	TNF
BRCA2	DDIT3	HMGA1	MOCOS	RBBP6	TNRC6A
C17orf91	DDX20	HMGA2	MOV10	RBL2	TNRC6B
CBS	DDX4	HMOX1	MSTN	RBPJL	TNRC6C
CCL7	DDX6	HNF4A	MYC	RDX	TP53
CCNA2	DERL1	HNRNPA1	MYCN	RET	TP63
CCND1	DGCR8	HOXA10	NCAPG	RNASEN	TP73

CCND2	DICER1	HOXA9	NCBP1	RNPC3	TRAF6
CCNG1	DNMT1	HRSP12	NCOA3	RORA	TRAT1
CCR4	DNMT3B	IFI44	NCOA4	ROS1	TREH
CD28	DUSP2	IFNA1	NES	RPE	TRIM17
CD4	DYRK2	IFNA2	NF2	RRBP1	TRIM32
CD46	E2F1	IFNG	NFKB1	RTN4	TUT1
CD69	E2F2	IGF1	NFKBIA	RUNX1	TWIST1
CD8A	E2F3	IGF1R	NFYC	RUNX2	UBE2I
CDC25A	ECD	IGF2BP1	NKIRAS2	SAGE1	UHRF1BP1
CDC25C	EGFR	IL10	NKX2-1	SCAP	UHRF2
CDC34	EGR1	IL13	NOL3	SCPEP1	VDR
CDK6	EIF2C1	IL17A	NOS2A	SELL	WEE1
CDKN1A	EIF2C2	IL1B	NPAT	SF4	WFS1
CDKN1B	EIF2C4	IL2RA	NPC1	SHH	WIBG
CDKN1C	EIF3A	IL6	NPM1	SKP1	XPO1
CDKN2A	EIF4E	IL8RA	NR1H2	SLC25A10	XRN1
CDKN2D	EIF4G1	ILF2	NRAS	SLC27A4	ZCCHC11
CEBPA	ELF4	ILF3	NRIP1	SLC7A1	ZCCHC6
CEBPB	ELK3	IRAK2	OPRM1	SLC7A5	ZEB1
CEBPZ	ELSPBP1	ITGB3	PAH	SMO	ZEB2
CGA	EPHA2	JAK2	PAK3	SMOX	ZNF167
CHAF1A	EPHB2	JARID1B	PAX7	SNAI2	ZNF362
CHEK1	ERBB2	KHSRP	PDCD6	SOAT1	ZNF512B
CISH	ERBB3	KISS1R	PDHA2	SOCS1	
CKAP4	ESR1	KIT	PDXP	SOCS3	

Yolak analizi için Webgestalt kullanılmıştır ve moleküler alt tipte ilk 3 miRNA'nın hedef genleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde kanser (Şekil 5.7), apoptoz, hücre döngüsü, p53, JAK/STAT, TGF-beta, mTOR gibi sinyal yollarında yer almaktadır ($p \leq 9.29e-09$).

Çizelge 5.10. Moleküler alt tip için ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri için KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Pathways in cancer	56	$p=7.75e-58$
Chronic myeloid leukemia	29	$p=1.79e-41$
Pancreatic cancer	26	$p=2.44e-36$
Prostate cancer	26	$p=2.99e-33$
Non-small cell lung cancer	21	$p=3.91e-30$
Bladder cancer	18	$p=7.94e-27$
Small cell lung cancer	21	$p=1.87e-25$
Jak-STAT signaling pathway	25	$p=2.47e-25$
Cell cycle	22	$p=1.98e-23$
ErbB signaling pathway	19	$p=3.56e-22$
MAPK signaling pathway	24	$p=1.87e-18$
p53 signaling pathway	13	$p=9.45e-15$
Apoptosis	14	$p=9.73e-15$
TGF-beta signaling pathway	13	$p=1.54e-13$
mTOR signaling pathway	8	$p=9.29e-09$

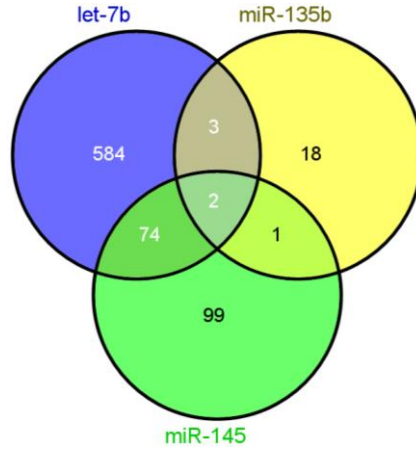


Şekil 5.7. Moleküler alt tip için ilk 3 miRNA ‘nın toplam hedef genlerinin 56 tanesinin örnek KEGG yolak analiz sonucu. Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.2.5. PR Statüsü için Belirteç Adayı miRNA’ların Hedef Genlerinin Bulunması ve Ortak Genlerin Yolak Analizi Sonuçları

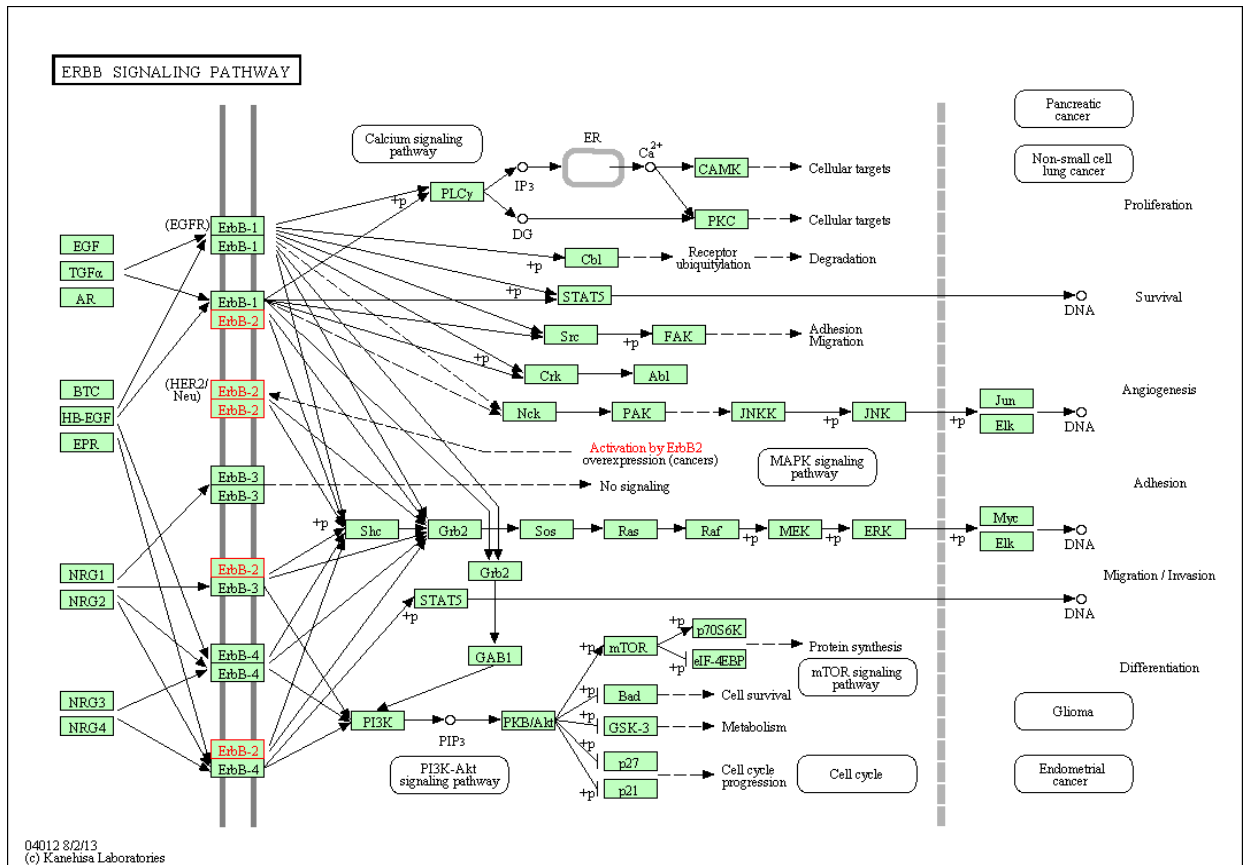
PR için *sonuç sıralama değerine* göre ilk sırada olan hsa-let-7b’nin 663 tane, ikinci sıradaki hsa-miR-135b’nin 24 tane, üçüncü sıradaki hsa-miR-145’in ise 176 tane deneysel olarak onaylanmış hedefi bulunmaktadır.

Ortak hedefler Venny kullanılarak araştırılmış ve 2 gen ilk 3 miRNA için ortak çıkmıştır(Şekil 5.8). Bu genler; **NPC1** ve **ERBB2**’dir.



Şekil 5.8. PR patolojik alt tipi için sonuç sıralama değerine göre ilk 3 miRNA'nın ortak hedef gen sayısını gösteren Venny aracı ile çizilmiş venn şeması.

Yolak analizi için genler ortak bir yolda bulunmadığı ve az sayıda gen araştırıldığı için Webgestalt üzerinden arama yapılmamış direk KEGG sitesi kullanılmıştır.



Şekil 5.9. PR için ilk 3 miRNA'nın ortak hedef genlerinden ERBB2 için KEGG yolak analiz sonucu. Hedef gen kırmızı ile gösterilmektedir.

5.3. Meta-analiz Sonucu Elde Edilen Örnek mRNA Listeleri

Geliştirilen meta-analiz programının 3 meme kanseri, mRNA, mikrodizin çalışması (Çizelge 4.3) için çalıştırılması sonucu elde edilen listede *sonuç sıralama değerine* göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar ER, Tümör Derecesi, HER2 ve PR için aşağıda verilmiştir (tam listeler ekli CD’dedir).

Moleküler alt tip bilgisi sadece bir mRNA mikrodizin çalışmasında (GSE17907) olduğu için moleküler alt tip için program tarafından sonuç listesi oluşturulmamıştır.

5.3.1. ER Statüsü için Meta-Analiz Sonucu Elde Edilen Örnek mRNA Listesi

Çizelge 5.11. ER için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.

mRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
AFF3	94.0	2	1
KMT2A	94.0	2	2
CCDC170	105.5	2	3
WWP1	213.0	3	4
COL4A4	230.5	2	5
FAM49A	281.5	2	6
USB1	289.3	3	7
PALM2	294.5	2	8
ZNF259	300.3	3	9
A2ML1	327.0	2	10
YBX1	368.3	3	11
USP6NL	428.3	3	12
UGCG	431.7	3	13
WFS1	433.3	3	14
YEATS2	435.5	2	15
ST8SIA1	454.5	2	16
TTC7A	486.3	3	17
UQCRH	487.7	3	18
UPP1	494.0	3	19
SPRYD3	507.5	2	20

5.3.2. Tümör Derecesi için Meta-Analiz Sonucu Elde Edilen Örnek mRNA Listesi

Çizelge 5.12. Tümör derecesi için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.

mRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
ZNF12	8.0	2	1
ZBTB16	99.0	2	2
ZKSCAN1	109.5	2	3
ZBTB20	190.0	2	4
ZFYVE9	237.0	2	5
XPOT	258.5	2	6
WSB2	269.5	2	7
ZNF385B	280.0	2	8
ZNF185	372.5	2	9
ZNF367	377.5	2	10
ZNF24	403.0	2	11
XXYLT1	406.0	2	12
ZFP36L2	407.0	2	13
ZNF765	411.0	2	14
WFDC2	411.5	2	15
ZNF300	420.5	2	16
VEZF1	448.5	2	17
UPF2	451.5	2	18
ZNF436	457.0	2	19
ZNF385A	459.0	2	20

5.3.3. HER2 Statüsü için Meta-Analiz Sonucu Elde Edilen Örnek mRNA Listesi

Çizelge 5.13. HER2 için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.

mRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
YY1AP1	135.0	2	1
ZNF341	215.0	2	2
ZP2	220.0	2	3
ZRANB2	229.0	2	4
ZRSR2	235.0	2	5
ZDHHC7	237.5	2	6
XPO7	271.0	2	7
ZFYVE21	278.0	2	8
XYLT2	294.0	2	9
ZNF251	295.5	2	10
ZFX	302.0	2	11
ZKSCAN8	309.0	2	12
WIPF2	329.5	2	13
ZNF318	337.0	2	14
ZNF141	349.5	2	15
ZNF710	364.0	2	16
ZNF830	415.5	2	17
ZCCHC17	418.5	2	18
ZNF559	419.0	2	19
VSTM2L	421.0	2	20

5.3.4. PR Statüsü için Meta-Analiz Sonucu Elde Edilen Örnek mRNA Listesi

Çizelge 5.14. PR için meta-analiz programından elde edilen listede sonuç sıralama değerine göre ilk 20’de bulunan mRNA’lar.

mRNA	Sıralamaların Ortalaması	Bulunan Çalışma Sayısı	Sonuç Sıralama Değeri
CCDC170	7.5	2	1
KMT2A	59.5	2	2
AFF3	59.5	2	3
WDR19	214.0	3	4
ARNTL2	233.5	2	5
CPNE8	257.0	2	6
USB1	273.7	3	7
UPP1	315.0	3	8
YBX1	328.0	3	9
XBP1	341.7	3	10
UBASH3B	344.0	2	11
ZC3H12C	344.3	3	12
ZMYND10	355.7	3	13
BCL2A1	367.0	2	14
FAM49A	367.0	2	15
WWP1	395.7	3	16
KCNJ11	416.0	2	17
ZNF552	435.7	3	18
CASC1	459.0	2	19
A2ML1	461.0	2	20

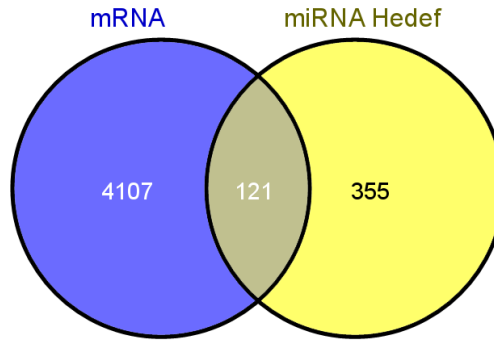
5.4. miRNA Hedef Gen Listelerinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listeleri ile Karşılaştırılması

miRNA hedef gen listeleriyle karşılaştırma yapılırken meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin *sonuç sıralama değerine* göre ilk %20’lik kısmı (tam listeler ekli CD’dedir) ve ER, HER2 ve PR için meta-analiz programından elde edilen *sonuç sıralama değerine* göre ilk 3 sıradaki miRNA’ların hedeflerinin hepsi kullanılmıştır.

Tümör derecesi için ise ilk 6 miRNA’yı anlamlı olabilecek şekilde let-7 ailesine dahil miRNA’lar (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7e, hsa-let-7i) oluşturduğu için karşılaştırma bu 6 miRNA’nın hedefleri toplamı üzerinden yapılmıştır.

5.4.1. ER Statüsü için Belirteç Adayı miRNA Hedef Listesinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listesi ile Karşılaştırılması

ER için meta-analiz sonucu elde edilen listede *sonuç sıralama değerine* göre ilk 3'te bulunan miRNA'ların deneysel olarak onaylanan hedeflerinin %25.4'ü mRNA listesinin ilk %20'si ile ortak çıkmıştır (Şekil 5.10).



Şekil 5.10. ER için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 3'ünün deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması. İki grup arasında 121 gen ortaktır.

Ortak olan 121 gen listelenmiştir (Çizelge 5.15).

Çizelge 5.15. ER için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları.

ER için ilk 3 miRNA'nın hedefleri ile mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları					
ANP32B	EHMT1	LY6K	PPL	SCAMP1	TMED7
ARID2	ELF4	LYPLA2	PPP3R1	SDCBP	TMEM109
AURKB	FADS2	MAP3K12	PPP5C	SEC23IP	TMEM189
BCL2	FMNL2	MPZL1	PRSS21	SERPINE2	TMEM41B
BECN1	FNDC3B	MRPS24	PSAT1	SFI1	TNFRSF10A
CA12	GARS	MSI2	PTPLAD1	SH3BGRL3	TRIP13
CCL13	GRIA2	MYBL2	PTPLB	SHOC2	TRMU

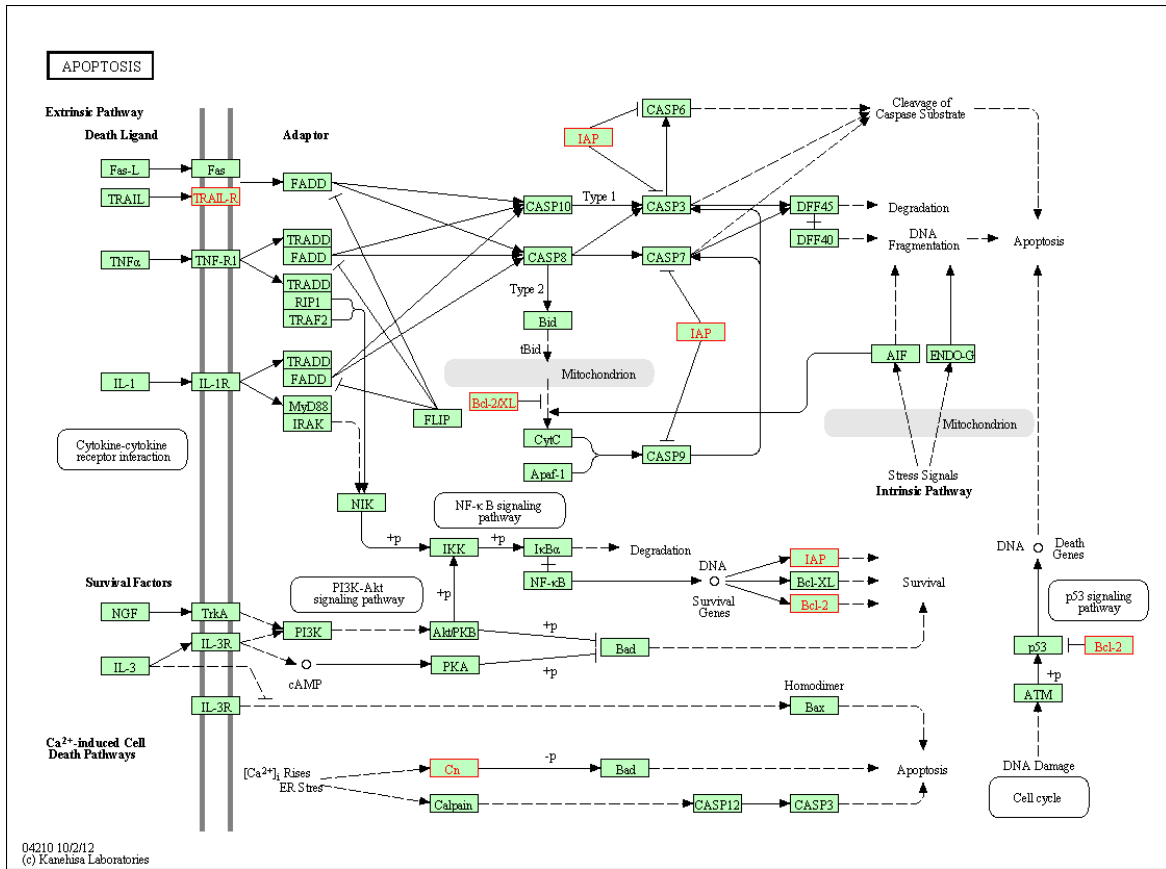
CDIPT	GTPBP3	MYO10	PTPRK	SLC16A3	TXNDC12
CDK6	HMGA1	MYO1E	PURA	SLC1A4	UAP1
CDKN2A	HSPA1A	NCAPG	PXDN	SLC25A13	UBE2I
CEBPB	IFNA1	NOTCH1	RAB27B	SLC4A7	UBE4A
CHAF1A	IFRD1	NXN	RAB30	SLC7A1	UGT8
CHORDC1	IGF2BP1	PAFAH1B2	RAI14	SLC7A6	VPS39
CLDN1	IGF2R	PAX6	RBMS1	SLC9A3R2	XIAP
CORO1C	KCNN4	PDCD4	RDH10	SNAP23	XPO5
CPNE8	KDEL2	PGM1	RHEB	SOD2	ZNF384
CTSC	KPNA3	PISD	RHOB	SRPR	
DMD	KRT7	PLK1	RHOG	STRN	
DOCK7	LMNB2	PODXL	RPP38	TAF9B	
DTD1	LRRC8C	POLA2	RQCD1	TARBP2	
EGFR	LUZP1	POLR2C	SAC3D1	THBS1	

Bu 121 gen ile WebGestalt üzerinden yolak analizi yapılmıştır ve genler istatistiksel olarak anlamlı şekilde apoptoz (Şekil 5.11), kanser, hücre döngüsü, MAPK ve p53 gibi sinyal yollarında yer almaktadır ($p \leq 0.0104$).

Çizelge 5.16. ER alt tipinde sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları için KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Apoptosis	4	$p=0.0038$
Bladder cancer	3	$p=0.0038$
Pancreatic cancer	3	$p=0.0046$
Glioma	3	$p=0.0046$
Non-small cell lung cancer	3	$p=0.0046$
Melanoma	3	$p=0.0046$
MAPK signaling pathway	5	$p=0.0046$
p53 signaling pathway	3	$p=0.0046$
Metabolic pathways	10	$p=0.0049$

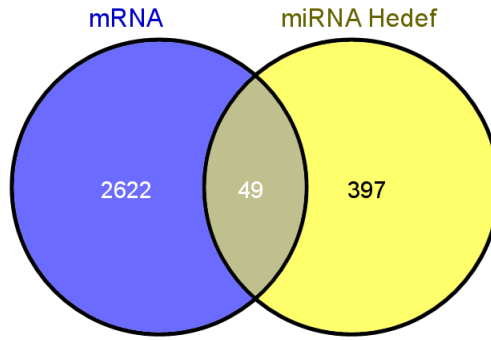
Glycerophospholipid metabolism	3	p=0.0051
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2	p=0.0051
Small cell lung cancer	3	p=0.0053
Pathways in cancer	5	p=0.0058
Cell cycle	3	p=0.0104
RNA transport	3	p=0.0132



Şekil 5.11. ER alt tipinde sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *apoptoz* yolağındaki 4 gen için KEGG yolak analiz sonucu (p=0.0038). Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.4.2. Tümör Derecesi için Belirteç Adayı miRNA Hedef Listesinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listesi ile Karşılaştırılması

Tümör derecesi için meta-analiz sonucu elde edilen listede *sonuç sıralama değerine* göre ilk 6'da bulunan miRNA'ların deneysel olarak onaylanan hedeflerinin %11'i mRNA listesinin ilk %20'si ile ortak çıkmıştır (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. Tümör derecesi için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 6'sının deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması.

Ortak olan 49 gen listelenmiştir (Çizelge 5.17).

Çizelge 5.17. Tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları.

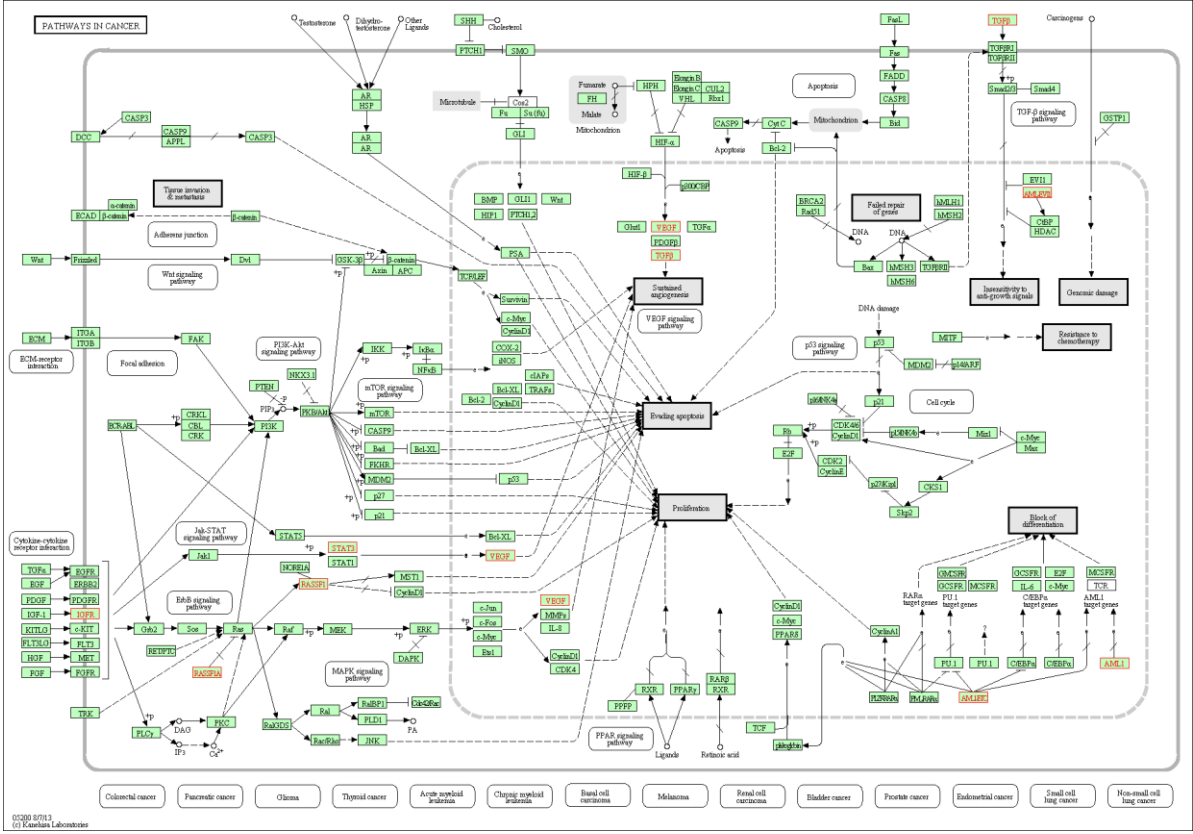
Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın hedefleri ile mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları				
ZEB2	TRIM32	SKP1	SRM	RBL2
TCF19	TGFB3	NCAPG	PBK	ME1
XRN1	TGFB1	PSD4	PDXP	IRAK2
STMN1	ZNF512B	RASSF1	TNRC6C	LAMP3
SOX2	SCAP	NUMA1	PDGFD	PRDM1
SOAT1	PSMA7	RPIA	VEGFA	IGF1R
SAMSN1	TP63	SOCS1	PGRMC1	RPE

SLC7A5	RUNX1	NRIP1	POLR2A	TWIST1
WFS1	TRIM41	MMP14	RORA	HMOX1
STAT3	TLR4	SLC27A4	SELL	

Bu 49 gen ile WebGestalt üzerinden yolak analizi yapılmıştır ve genler istatistiksel olarak anlamlı şekilde kanser (Şekil 5.13), hücre döngüsü, MAPK, Jak-STAT ve TGF-beta gibi sinyal yollarında yer almaktadır ($p \leq 0.0139$).

Çizelge 5.18. Tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarının KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

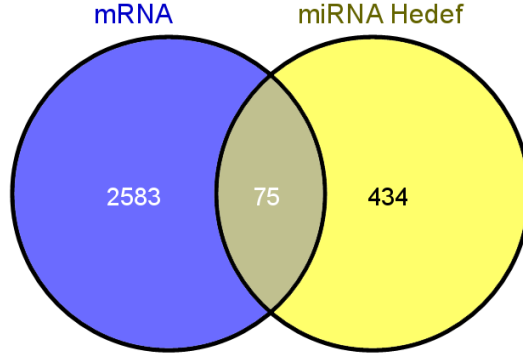
Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Pathways in cancer	7	$p=2.77e-06$
Pancreatic cancer	4	$p=1.37e-05$
TGF-beta signaling pathway	4	$p=2.12e-05$
Cell cycle	4	$p=6.67e-05$
Renal cell carcinoma	3	$p=0.0002$
Chronic myeloid leukemia	3	$p=0.0002$
Bladder cancer	2	$p=0.0021$
Metabolic pathways	6	$p=0.0029$
Acute myeloid leukemia	2	$p=0.0030$
Colorectal cancer	2	$p=0.0035$
Melanoma	2	$p=0.0042$
PPAR signaling pathway	2	$p=0.0042$
MAPK signaling pathway	3	$p=0.0045$
Prostate cancer	2	$p=0.0055$
Jak-STAT signaling pathway	2	$p=0.0139$



Şekil 5.13. Tümör derecesi için sıralamadaki ilk 6 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *kanser yolağı*ndaki 7 gen için KEGG yolak analiz sonucu ($p=2.77e-06$). Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.4.3. HER2 Statüsü İçin Belirteç Adayı miRNA Hedef Listesinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listesi ile Karşılaştırılması

HER2 için meta-analiz sonucu elde edilen listede *sonuç sıralama değeri*ne göre ilk 3'te bulunan miRNA'ların deneysel olarak onaylanan hedeflerinin **%14.7**'si mRNA listesinin ilk %20'si ile ortak çıkmıştır (Şekil 5.14).



Şekil 5.14. HER2 için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 3'ünün deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması.

Ortak olan 75 gen listelenmiştir (Çizelge 5.19).

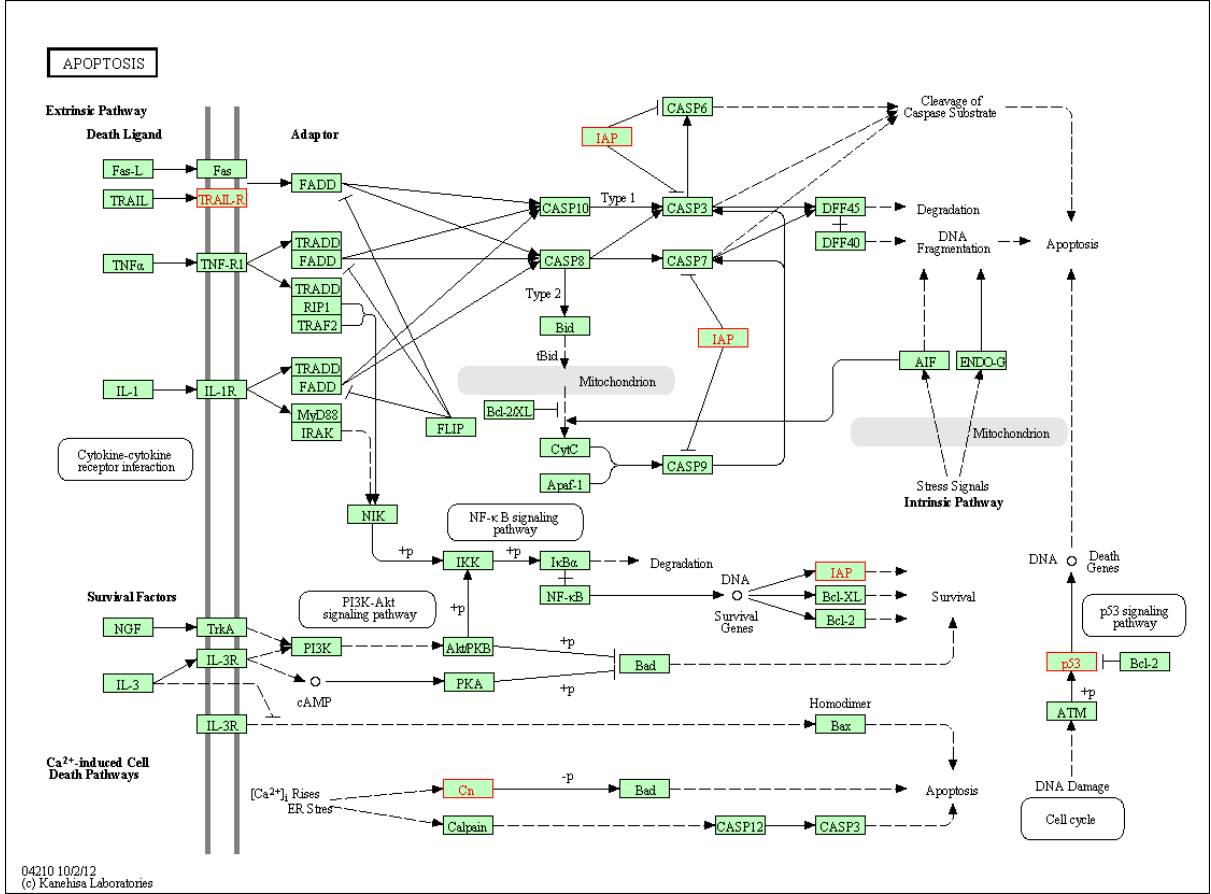
Çizelge 5.19. HER2 için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları.

HER2 için ilk 3 miRNA'nın hedefleri ile mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları				
TNFRSF10B	RAB22A	NCL	P4HA2	MRPL20
THEM4	TMEM41B	SH3BP4	NOTCH1	FADS2
TRMT1	SMARCA5	TP53	SRPRB	SEC24A
TMED3	SLC7A6	TMED7	MBNL1	NAPG
SLC25A13	SLC25A1	RTN4	LRRC8A	JAK2
TMEM189	SLC4A7	TPM3	PPP3R1	PTBP2
SOX2	WT1	NAT6	RBM19	SPCS3
TACSTD2	SSNA1	NEDD4	TMCO1	GOLGA7
TRIP13	TAF9B	SLC12A4	IDH1	MYBL2
UNC5C	VAMP3	TGFBR1	RAB30	PKN2
PTPLB	RELB	MYO10	GPR56	PWP1
PSMA7	PPP1R13B	UBE4A	IGF1R	
TMEM59	RCOR1	PPM1D	PLK1	
PXDN	VTI1B	PPL	PSAT1	
SFI1	NUFIP2	ZNF622	XIAP	
POLR2C	SLC38A5	LUZP1	PEX11B	

Bu 75 gen ile WebGestalt üzerinden yolak analizi yapılmıştır ve genler istatistiksel olarak anlamlı şekilde kanser, hücre döngüsü, apoptoz (Şekil 5.15), MAPK ve p53 gibi sinyal yollarında yer almaktadır ($p \leq 0.0263$).

Çizelge 5.20. HER2 için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarının KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

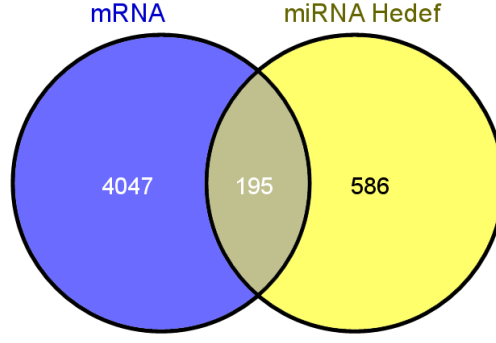
Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Apoptosis	4	p=0.0005
p53 signaling pathway	3	p=0.0032
Pathways in cancer	5	p=0.0032
MAPK signaling pathway	4	p=0.0046
Thyroid cancer	2	p=0.0046
Melanoma	2	p=0.0121
Adherens junction	2	p=0.0121
Glioma	2	p=0.0121
Chronic myeloid leukemia	2	p=0.0121
Colorectal cancer	2	p=0.0121
Pancreatic cancer	2	p=0.0121
Small cell lung cancer	2	p=0.0144
Prostate cancer	2	p=0.0147
Cell cycle	2	p=0.0263
Wnt signaling pathway	2	p=0.0312



Şekil 5.15. HER2 için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *apoptoz* yolağındaki 4 gen için KEGG yolak analiz sonucu(p=0.0005). Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.4.4. PR Statüsü için Belirteç Adayı miRNA Hedef Listesinin Meta-Analiz Yönteminin Uygulandığı mRNA Çalışmalarından Çıkan Gen Listesi ile Karşılaştırılması

PR için meta-analiz sonucu elde edilen listede *sonuç sıralama değerine* göre ilk 3'te bulunan miRNA'ların deneysel olarak onaylanan hedeflerinin %25'i mRNA listesinin ilk %20'si ile ortak çıkmıştır (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. PR için meta-analiz sonucu elde edilen mRNA listesinin ilk %20'si ile miRNA listesinin ilk 3'ünün deneysel olarak onaylanan hedeflerinin ortak sayısını gösteren venn şeması.

Ortak olan 195 gen listelenmiştir (Çizelge 5.21).

Çizelge 5.21. PR için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları.

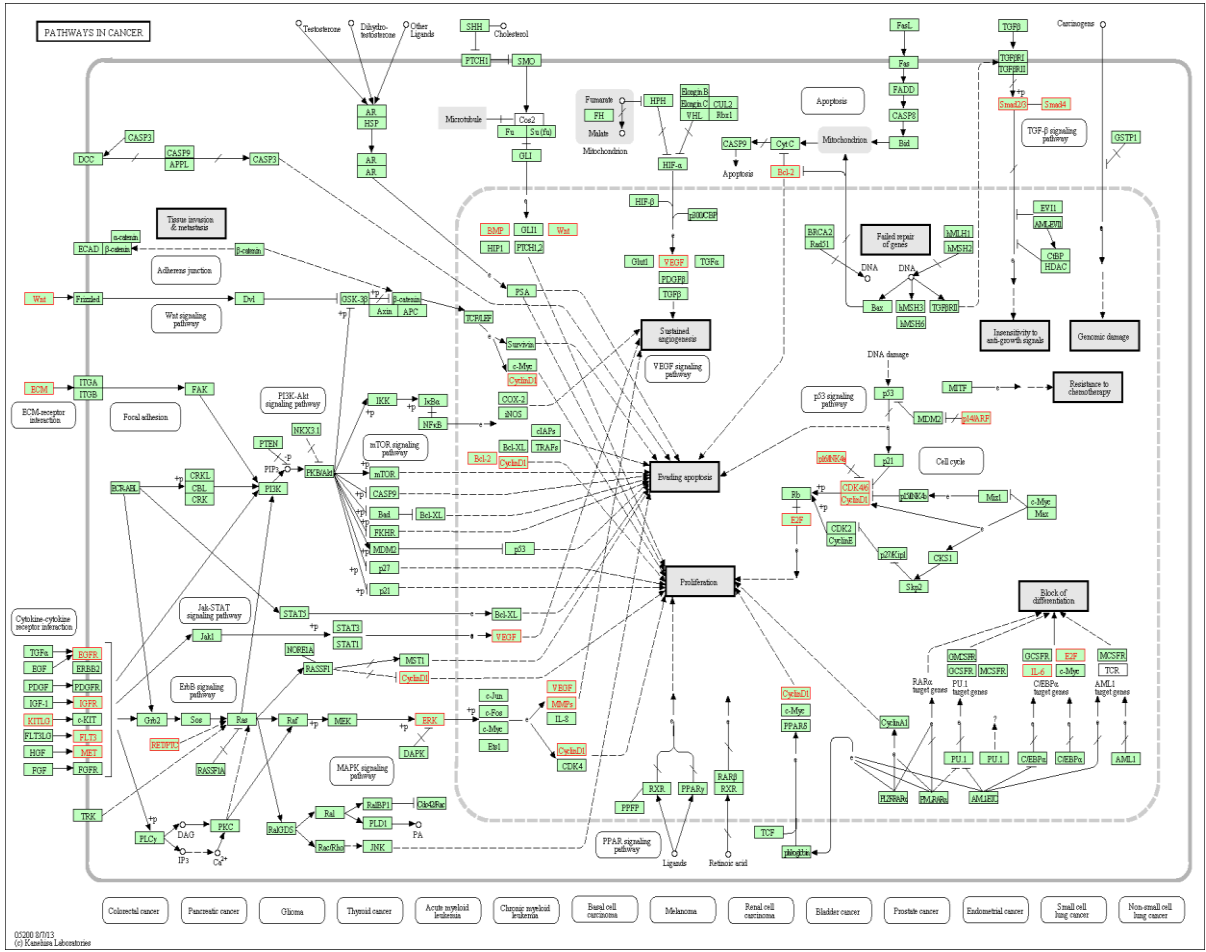
PR için ilk 3 miRNA'nın hedefleri ile mRNA listesinin ilk %20'sinin ortakları				
KDELC2	NXN	MET	SLC7A1	MID1
CCND1	CTSC	UGT8	DOCK7	SMAD5
SDCBP	SOCS3	MSI2	RHEB	MYEF2
STX7	GARS	RET	ATAD3B	BMP2
CCL7	AURKB	KLF5	E2F3	HOXA1
SKP1	ZCCHC6	RDH10	PROM1	DBP
MYO10	TMED7	FNDC3B	TMEM41B	MAPRE2
ZCCHC11	TNRC6A	FOXP1	RPIA	IRS1
HMGA1	RHOG	PRDM1	SLC30A1	RTKN
IL6	CHD1	PTPRK	RAB30	SOAT1
STK24	MAPK3	TAF1C	KCNN4	KRT7
BCL2	UBE4A	SHOC2	CKAP4	BEX1
CHEK1	TPPP3	ARID2	ERBB3	HSD11B1
UHRF2	TMEM109	STRN	COL4A2	FSCN1
RHOB	ESR1	PGM1	TMEM2	SRF

TMED10	PI3	ANP32B	CPOX	MUC1
SNAP29	LRRC8C	KISS1R	SCAMP1	SRGAP2
CDK6	CDC25A	TRMU	ELF4	PAK1
TAF9B	E2F2	WNT5A	LUZP1	SOD2
RAB27B	MYCN	IQGAP3	DNMT3B	ROBO2
CDIPT	LAMC1	LMNB2	SLC7A5	SMAD3
PTPMT1	FOXA1	SRM	TCF19	NKX2-5
CPNE8	PLXND1	PURA	KPNA3	SMAD4
SFI1	CDKN2A	SOCS1	SLC1A4	BLM
NCAPG	NRIP1	PAK3	TRIP13	MMP9
CEBPB	TYMS	POLA2	DUSP2	TSC2
WEE1	FLT3	FADS1	TNFAIP2	CAP1
RAI14	CORO1C	CSAD	LYPLA2	ADAM17
PAFAH1B2	ROS1	DNAJC19	CCNA2	RPS14
EGFR	RDX	UBE2I	WFS1	SMTN
LAMP3	SLC25A13	EPHA2	KITLG	RHOF
NPC1	KHSRP	SLC4A7	MYO1E	YES1
SLC9A3R2	TNRC6C	SERPINE2	SLC16A3	PPP2R1B
SCPEP1	LCPI	VPS39	TMEM189	MAPK7
SMAD1	FADS2	IMPACT	LY6K	TBC1D9
THEM4	IGF1R	CA12	PSAT1	
ATG9A	RBMS1	VEGFA	PTPLAD1	
PLOD3	SH3BGRL3	PSD4	SMOX	
IGF2R	VDR	EPHB2	PPP3R1	
PODXL	SNAP23	PRSS21	FMNL2	

Bu 195 gen ile WebGestalt üzerinden yolak analizi yapılmıştır ve genler istatistiksel olarak anlamlı şekilde kanser(Şekil 5.17), hücre döngüsü, MAPK, ErbB, p53 ve TGF-beta gibi sinyal yollarında yer almaktadır($p \leq 0.0006$).

Çizelge 5.22. PR için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarının KEGG yolak analizi örnek sonuç tablosu.

Yolak Adı	Gen Sayısı	Anlamlılık Değeri
Pathways in cancer	22	$p=1.64e-17$
Cell cycle	12	$p=2.18e-11$
Pancreatic cancer	10	$p=2.42e-11$
Bladder cancer	8	$p=3.20e-10$
Melanoma	9	$p=6.30e-10$
Glioma	8	$p=8.36e-09$
Chronic myeloid leukemia	8	$p=1.85e-08$
TGF-beta signaling pathway	8	$p=4.21e-08$
Non-small cell lung cancer	7	$p=4.21e-08$
Prostate cancer	7	$p=1.02e-06$
Wnt signaling pathway	7	$p=3.23e-05$
p53 signaling pathway	5	$p=7.19e-05$
Renal cell carcinoma	5	$p=7.79e-05$
ErbB signaling pathway	5	$p=0.0002$
MAPK signaling pathway	7	$p=0.0006$



Şekil 5.17. PR için sıralamadaki ilk 3 miRNA'nın toplam hedefleri ile meta-analiz programından çıkan mRNA listesinin ilk %20'sinin ortaklarından *kanser yolağı*ndaki 22 gen için KEGG yolak analiz sonucu ($p=1.64e-17$). Hedef genler kırmızı ile gösterilmektedir.

5.5. Belirteç Adayı miRNA'ların Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

ER, HER2 ve tümör derecesi için seçilen miRNA'lar ile yapılan eş-zamanlı PZR sonuçları ile çizilen grafikler aşağıdadır. Temsili miRNA Eş-Zamanlı PZR Sonuçları EK2'dedir.

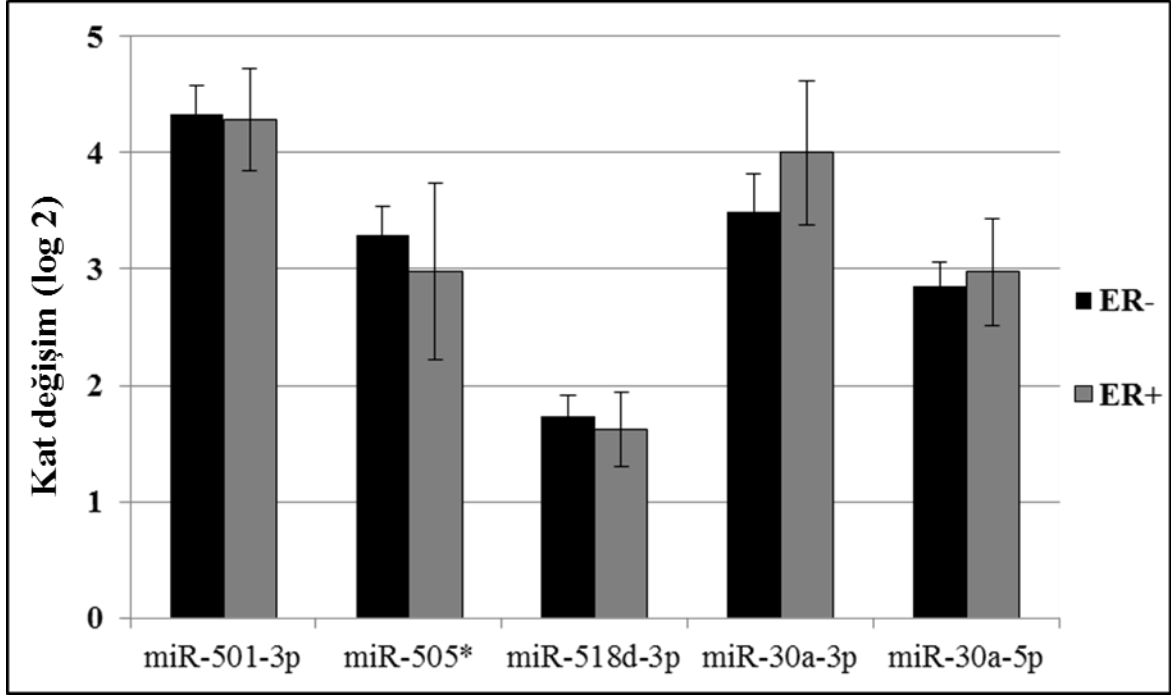
5.5.1. ER Statüsü için Belirteç Adayı miRNA'ların Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

ER statüsü için seçilen miRNA'lar ile istatistiksel olarak anlamlı sonuç alınamamıştır.

Eş-zamanlı PZR ER statüsü bilgisi olan 15 bağımsız tümör örneği ile gerçekleştirilmiştir.

Bu örneklerin 5 tanesi ER+, 10 tanesi ER-tir.

ER (-) ve ER(+) tümörler arasında farklılık gösteren meta-miRNAlar



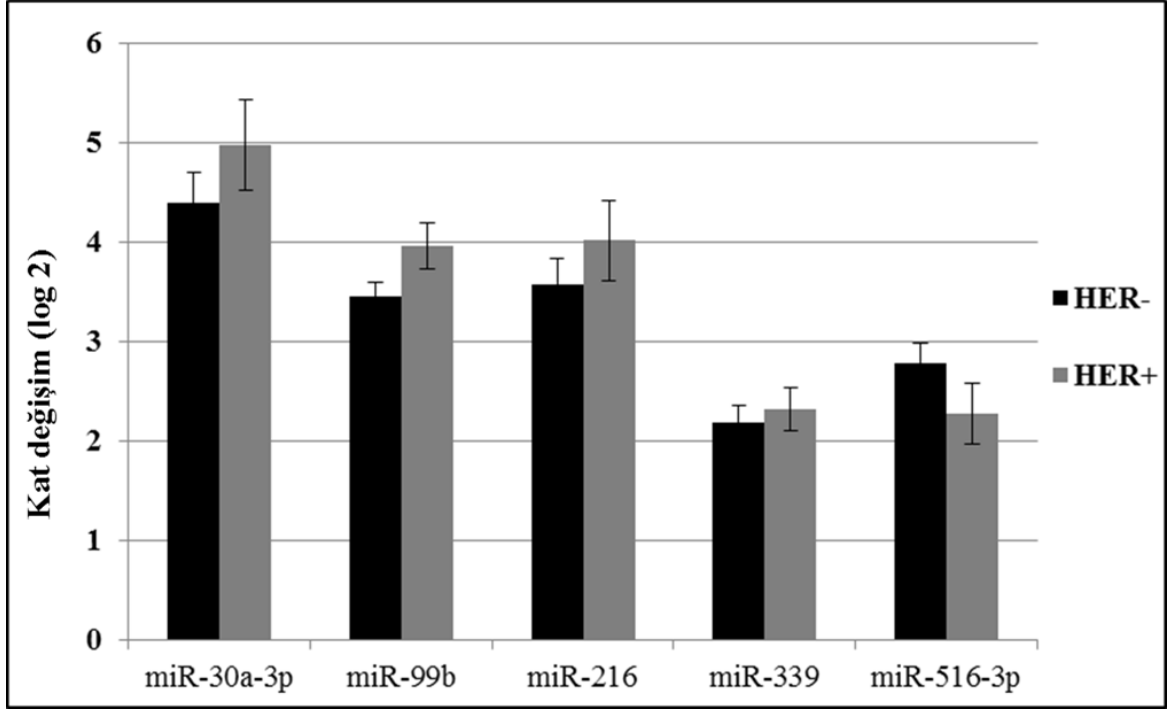
Şekil 5.18. ER- ve ER+ tümörler arasında eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=15).

5.5.2. HER2 Statüsü için Belirteç Adayı miRNA'ların Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

HER2 statüsü için seçilen miRNA'lar ile istatistiksel olarak anlamlı sonuç alınamamıştır.

Eş-zamanlı PZR HER2 statüsü bilgisi olan ve 7 tanesi HER2-, 7 tanesi HER2+ toplam 14 bağımsız tümör örneği ile gerçekleştirilmiştir.

HER2 (-) ve HER2(+) tümörler arasında farklılık gösteren meta-miRNAlar

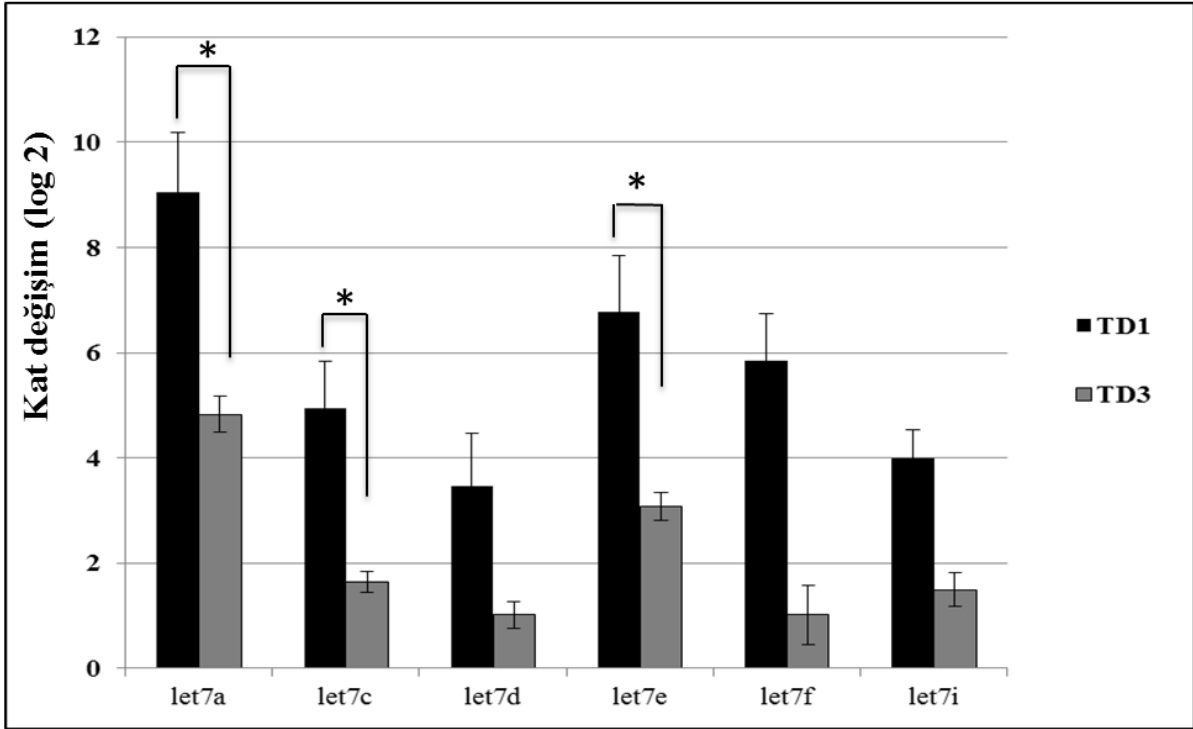


Şekil 5.19. HER2- ve HER2+ tümörler arasında eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=14).

5.5.3. Tümör Derecesi için Belirteç Adayı miRNA'ların Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

- Tümör derecesini birbirinden ayıran meta-miRNA listesindeki ilk 6 miRNA (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a, hsa-let-7i) ile yapılan eş-zamanlı PZR'de bu miRNA'ların genel olarak bir azalma gösterdiği ve hsa-let-7a, hsa-let-7c ve hsa-let-7e'deki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.20).
- Eş-zamanlı PZR tümör derecesi bilgisi olan 21 bağımsız tümör örneği ile gerçekleştirilmiştir. Bu örneklerin 4 tanesi TD1, 11 tanesi TD2 ve 6 tanesi TD3 statüsündedir.

Tümör dereceleri 1 ve 3 arasında farklılık gösteren meta-miRNAlar



Şekil 5.20. Tümör derecesi 1 (TD1) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği. hsa-let-7a, hsa-let-7c ve hsa-let-7e TD3 olan örneklerde TD1 olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (n=10, t-test; $p \leq 0.05$).

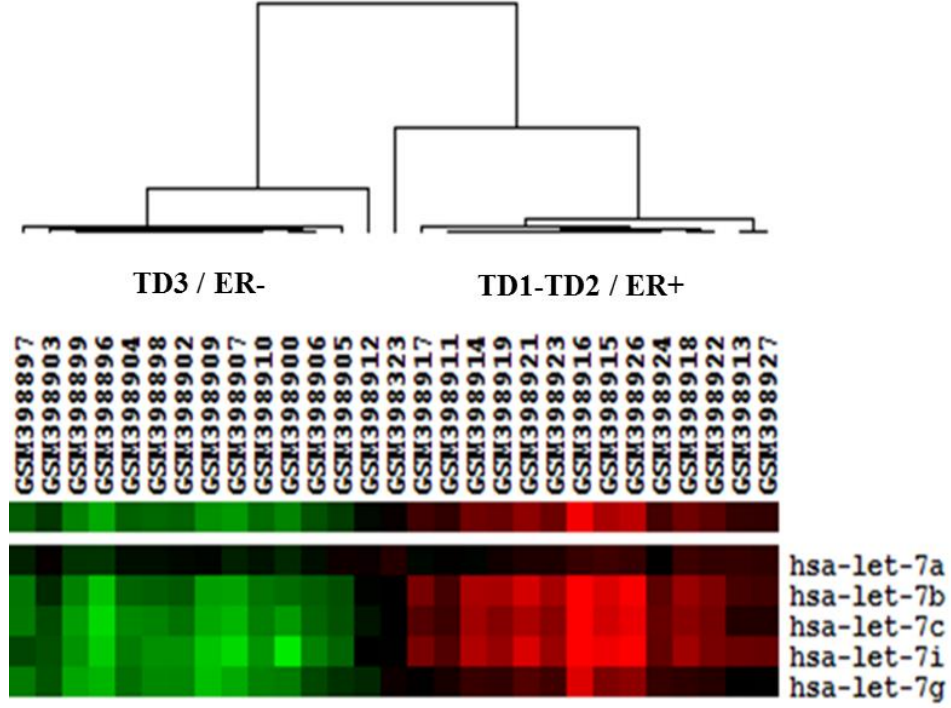
- hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a ve hsa-let-7i için eş-zamanlı PZR sonucunda elde edilen veriler ile yapılan ayırma analizi (Discriminant Function Analysis) ise bu 6 miRNA'nın birlikte tümör derecesi 3'ü 100%'lük bir verim ile tahmin edebildiğini göstermektedir (Çizelge 5.23).

Çizelge 5.23. hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a ve hsa-let-7i için ayırma analizi (Discriminant Function Analysis) sonucu elde edilen tablo. Tablo bu 6 miRNA bir arada kullanıldığında TD3'ün %100, TD2'nin %90.9, TD1'in ise %66.7'lik bir verim ile tahmin edilebildiğini göstermektedir. Analiz 20'de 2 lik bir hata payı içermektedir.

Put into Group	True Group		
	1	2	3
1	2	1	0
2	1	10	0
3	0	0	6
Total N	3	11	6
N correct	2	10	6
Proportion	0.667	0.909	1.000

N = 20 N Correct = 18
 ProportionCorrect = 0.900

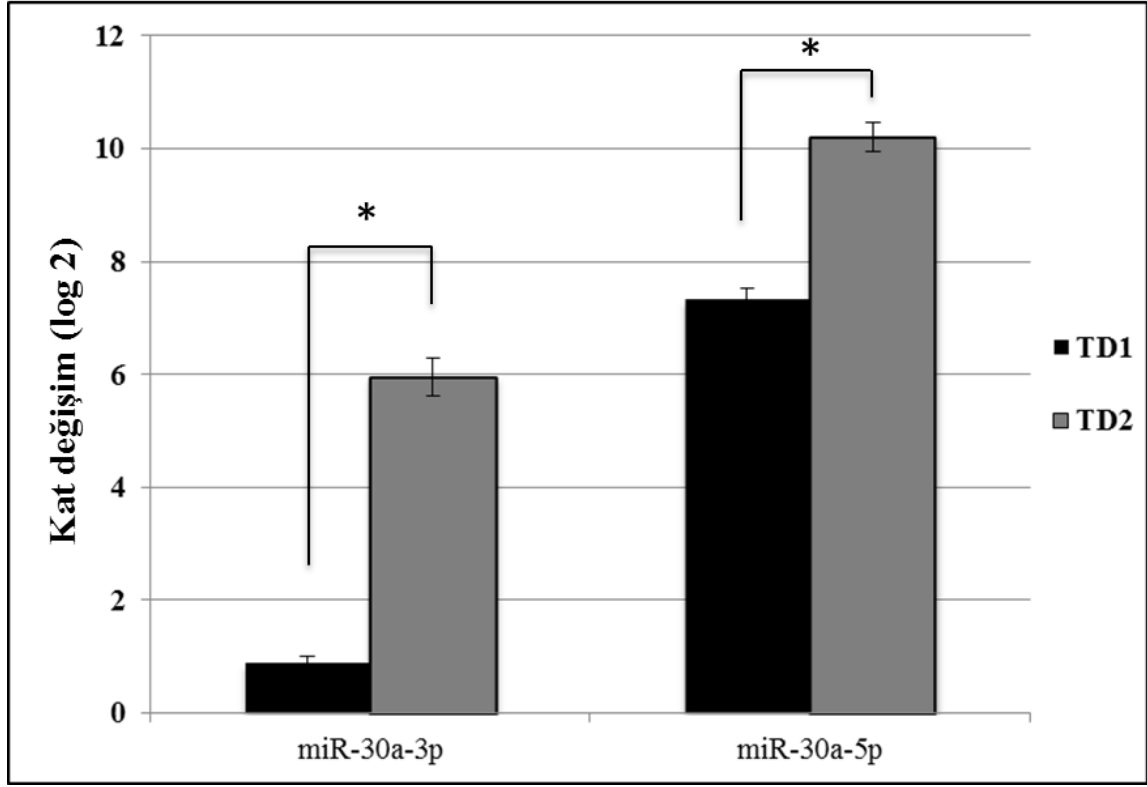
- 6 miRNA (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a ve hsa-let-7i) ile GSE15885 verisi kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme çalışmasında iki grup arasında tümör derecesi sınıflandırması yapıldığında grup 1'de TD3 örneklerin istatistiksel olarak anlamlı olarak kümelendiği bulunmuştur (Mann-Whitney; W=264, p=0.0082). Ayrıca grup 1'de bulunan örnekler anlamlı olarak ER negatiftir (Mann-Whitney; W=170.5, p=0.0483) ve ifade değerlerine bakıldığında eş-zamanlı PZR bulgularımızla paralel olarak bu miRNA'lar TD3 örneklerdeTD1 örneklere göre azalan ifade göstermiştir (Şekil 5.21).



Şekil 5.21. GSE15885 çalışmasından elde edilen veriler ile hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a ve hsa-let-7i için çizilen heatmap. Hiyerarşik kümeleme çalışmasında iki grup arasında tümör derecesi sınıflandırması yapıldığında grup 1’de TD3 örneklerin istatistiksel olarak anlamlı olarak kümelendiği bulunmuştur (Mann-Whitney; $W=264$, $p=0.0082$). Ayrıca grup 1’de bulunan örnekler anlamlı olarak ER negatiftir (Mann-Whitney; $W=170.5$, $p=0.0483$) (kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk ise azalan ifadeyi temsil etmektedir).

- Let-7 ailesine ek olarak tümör örnekleri ile yaptığımız eş-zamanlı PZR sonucunda, tümör derecesini birbirinden ayıran meta-miRNA listesinde ilk 20 arasında yer alan miR-30a-3p ve miR-30a-5p’nin (14. ve 8. sırada), tümör derecesi 1 ve 2’yi birbirinden anlamlı olarak ayırdığı bulunmuştur. Tümör derecesi ile doğru orantılı olarak derece arttıkça bu iki miRNA’nın ifadesinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.22).

Tümör dereceleri 1 ve 2 arasında farklılık gösteren meta-miRNAlar



Şekil 5.22. Tümör derecesi 1 (TD1), tümör derecesi 2 (TD2) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği. hsa-miR-30a-3p ve hsa-miR-30a-5p TD2 olan örneklerde TD1 olanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.01$).

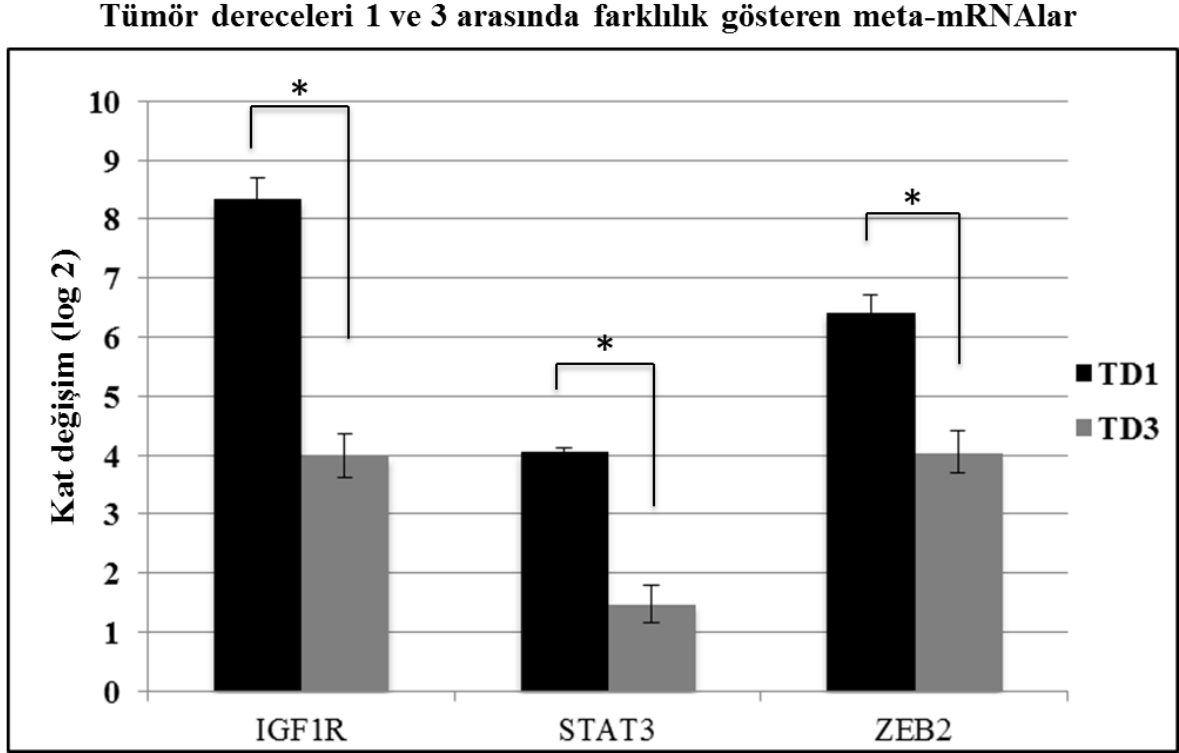
5.6. Seçilen mRNA'ların Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

Tümör derecesi için ilk 6 miRNA'nın deneysel olarak onaylanmış hedefleri ile mRNA listesinin (meta-analiz sonucu elde edilen) ilk %20'sinin ortağı olan 49 genin 10 tanesi ile yapılan eş-zamanlı PZR sonucunda;

- IGF1R, STAT3 ve ZEB2'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD1 örneklere göre azaldığı
- STAT3'ün ifadesinin TD2 örneklere TD1 örneklere göre azaldığı
- TGFB1, IGF1R ve ZEB2'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD2 örneklere göre azaldığı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar için çizilen grafikler aşağıdadır. (Temsili mRNA Eş-Zamanlı PZR Sonuçları EK3'tedir.)

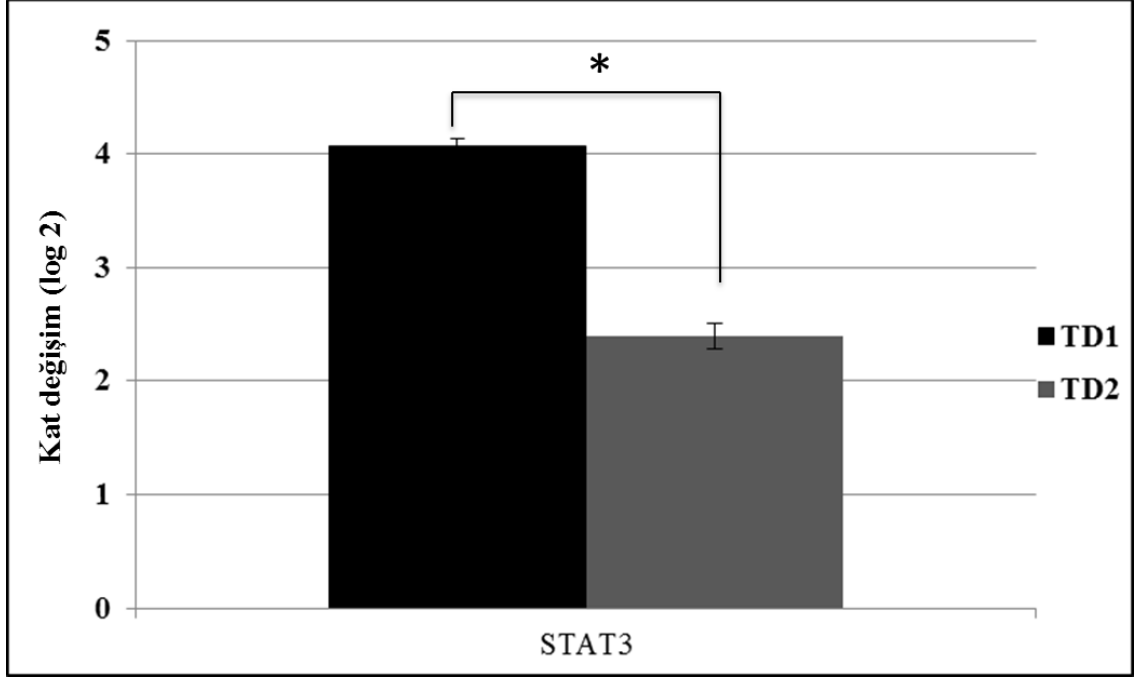
Tümör derecesi bilinen 10 bağımsız tümör örneği ile yapılan eş-zamanlı PZR sonucunda IGF1R, STAT3 ve ZEB2'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD1 örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 5.23).



Şekil 5.23. Tümör derecesi 1 (TD1) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen mRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği. IGF1R, STAT3 ve ZEB2'nin ifadesi TD3 örneklerde TD1 örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (n=10, $p \leq 0.05$).

Tümör derecesi bilinen 15 bağımsız tümör örneği ile yapılan eş-zamanlı PZR sonucunda STAT3'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD1 örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 5.24).

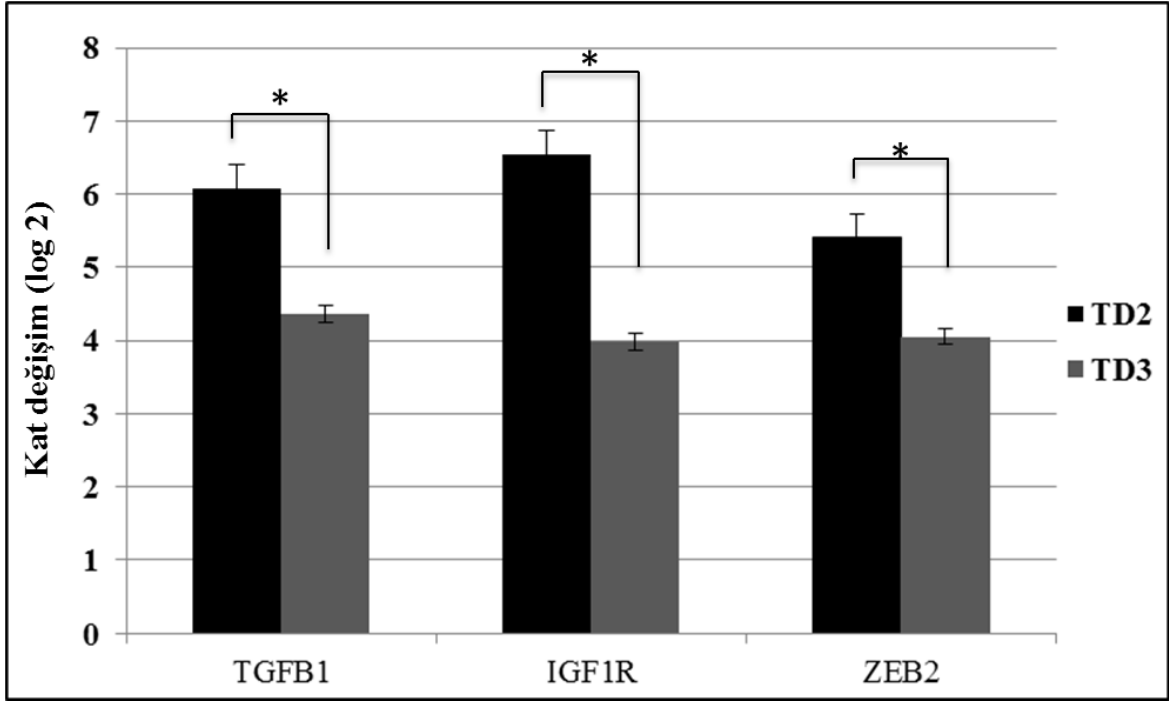
Tümör dereceleri 1 ve 2 arasında farklılık gösteren meta-mRNAlar



Şekil 5.24. Tümör derecesi 1 (TD1) ve tümör derecesi 2 (TD2) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen mRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği. STAT3'nin ifadesi TD2 (n=11) örneklerde TD1 (n=4) örneklerle istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (n=15, $p \leq 0.05$).

Tümör derecesi bilinen 17 bağımsız tümör örneği ile yapılan eş-zamanlı PZR sonucunda TGFB1, IGF1R ve ZEB2'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD2 örneklerle istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 5.25).

Tümör dereceleri 2 ve 3 arasında farklılık gösteren meta-mRNAlar

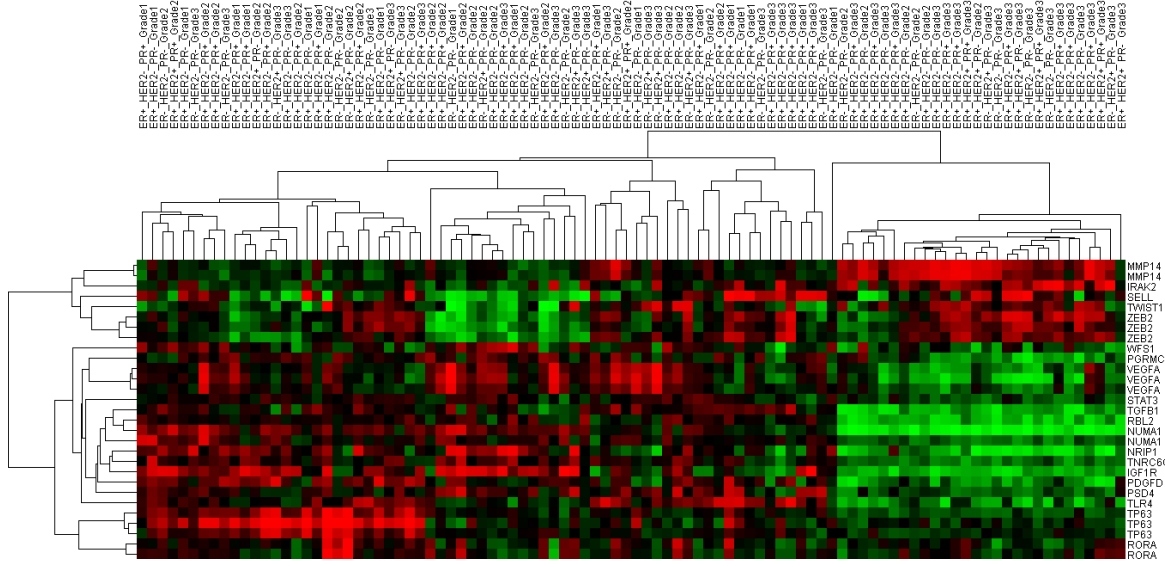


Şekil 5.25. Tümör derecesi 2 (TD2) ve tümör derecesi 3 (TD3) için eş-zamanlı PZR ile ifade farklılığı analiz edilen mRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği. TGFB1, IGF1R ve ZEB2'nin ifadesi TD3 örneklerde TD2 örneklere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (n=17, p≤0.05).

5.7. Seçilen mRNA'ların Biyoinformatik Analiz Sonuçları

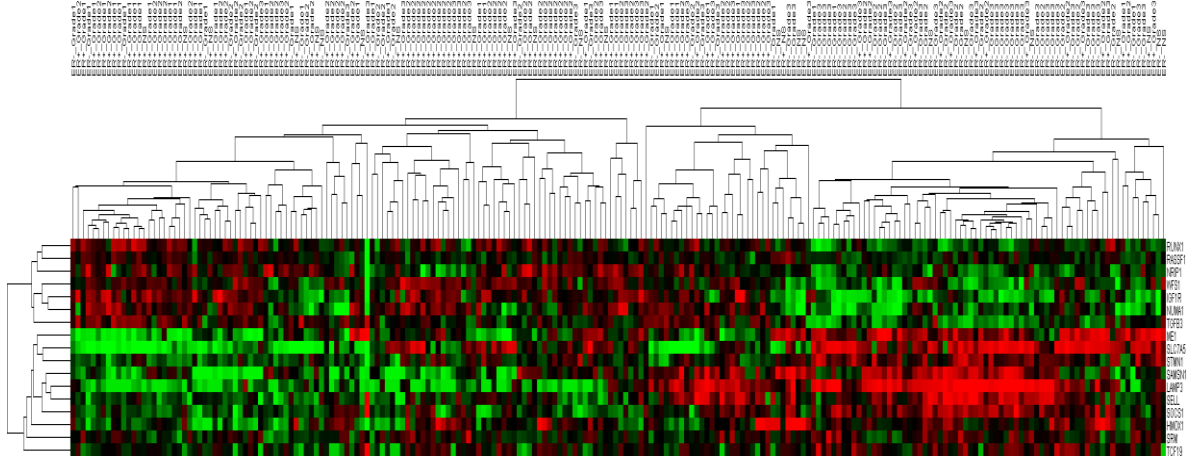
Tümör derecesi için ilk 6 meta-miRNA'nın deneysel olarak onaylanmış hedefleri ile meta-mRNA listesinin (meta-analiz sonucu elde edilen) ilk %20'sinin ortağı olan 49 genin (Çizelge 5.17) tamamı ile BRB-Array Tools kullanılarak bağımsız çalışmalarda yapılan biyoinformatik analiz sonucunda;

E-MTAB-1006 çalışmasında 49 gen üzerinden ve seçilen gruplar için (TD1, TD2 ve TD3) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren genlerin tespit edildiği "class comparison" analizi yapıldığında; 20 genin (TGFB1, NUMA1, TNRC6C, RBL2, PGRMC1, STAT3, VEGFA, IRAK2, ZEB2, PSD4, NRIP1, PDGFD, RORA, WFS1, SELL, MMP14, IGF1R, TP63, TWIST1, TLR4) istatistiksel olarak anlamlı şekilde TD dereceleri arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur (p≤0.05). Bu genler arasında bulunan IGF1R ve STAT3 eş-zamanlı PZR ile analizi yapılan 10 gen (Çizelge 4.7) arasındadır ve sonuçlar birebir paralellik göstermektedir.



Şekil 5.26. E-MTAB-1006 çalışmasında 49 gen üzerinden ve seçilen gruplar için (TD1, TD2 ve TD3) “Class comparison” (sınıf karşılaştırması) analizi sonucu elde edilen istatistiksel olarak anlamlı olarak farklılık gösteren 20 gen ile çizilen heatmap ($p \leq 0.05$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk ise azalan ifadeyi temsil etmektedir.

GSE22219 çalışmasında 49 gen üzerinden ve seçilen gruplar için (TD1, TD2 ve TD3) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren genlerin tespit edildiği “class comparison” analizi yapıldığında; 17 genin (SLC7A5, LAMP3, IGF1R, SOCS1, ME1, TGFB3, STMN1, WFS1, RUNX1, SRM, TCF19, NUMA1, SAMSN1, NRIP1, RASSF1, SELL, HMOX1) istatistiksel olarak anlamlı şekilde tümör dereceleri arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Bu genler arasında bulunan IGF1R eş-zamanlı PZR ile analizi yapılan 10 gen (Çizelge 4.7) arasındandır ve sonuçlar birebir paralellik göstermektedir.



Şekil 5.27. GSE22219 çalışmasında 49 gen üzerinden ve seçilen gruplar için (TD1, TD2 ve TD3) “Class comparison” (sınıf karşılaştırması) analizi sonucu elde edilen istatistiksel olarak anlamlı olarak farklılık gösteren 17 gen ile çizilen heatmap ($p \leq 0.05$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk ise azalan ifadeyi temsil etmektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meta-analiz Yöntemi

Meta-analiz, çeşitli mikrodizin çalışmalarını istatistiksel yöntemler kullanarak bir araya getirmeyi amaçlayan bir yöntemdir. Birçok çalışmadan gelen bilgiler bir araya getirildiği için tek çalışmayla sınırlı kalmayan daha genel bir bilgiye ulaşmayı sağlayan güçlü bir araçtır. Meta-analiz yaklaşımlarında karşılaşılan en büyük problem çalışmaların farklı platformlardan geliyor olmasıdır. Her platformun kendine özgü prob tasarımı ve analiz yaklaşımları olduğu için verileri bir araya getirirken bu farkları elimine edecek yöntemler seçilmesi kaçınılmazdır. Bu çalışma için bir araya getirilen verilerin geldikleri platformlar birbirinden çok farklı özellikte olduğu için MATLAB programa dili kullanılarak **sıralama tabanlı** bir meta-analiz yöntemi geliştirilmiştir (Şekil 4.11). Bugüne kadar yapılmış sıralama tabanlı meta-analiz yaklaşımları bu tür çalışmaların klinik farklılıklara, platform heterojenitesine ve analiz kaynaklı sorunlara dirençli olduğunu göstermiştir (79, 87). Bu meta-analiz yöntemi ile hem her türlü platformdan veriyi bir araya getirmek hem de literatürde yapılan çalışmaların sayısı arttıkça yeni verileri meta-analize eklemek mümkün olacaktır. Bu anlamda program dinamik bir programdır.

Farklı kanser tiplerini analiz eden miRNA mikrodizin çalışmalarının sayısı gün geçtikçe artsa da şimdiye kadar meme kanseri ile ilgili mikroRNA mikrodizin çalışmalarını kapsayan bir meta-analiz çalışması yapılmamıştır. **Gerçekleştirilen çalışma bu anlamda ilk olması ile özgün bir değere ve öneme sahiptir.**

Hala yeni miRNA'ların bulunuyor olması, ortak veritabanlarının bu hızlı miRNA eklemeleri ile sürekli güncelleniyor olması ve isimlendirilmede yapılan büyük değişiklikler (Bölüm 2.2.4'te anlatılmıştır) miRNA anotasyonlarında tutarsızlığa yol açmaktadır. Bu sebeple bir miRNA için her mikrodizin platformunda farklı adlandırma ile karşılaşmak mümkündür. Örneğin hsa-miR-30a bir çalışmada hsa-miR-30a olarak adlandırılırken başka bir çalışmada hsa-miR-30a-5p olarak adlandırılmakta, bu da aynı diziye karşılık gelseler de isimler ortak olmadığı için miRNA'nın analizden elenmesine sebep olmaktadır. Bu durum, farklı platformları bir araya getirmeyi oldukça zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada da yapıldığı üzere farklı çalışmaları bir araya getirmek için **ortak miRNA adları** kullanılmakta bu da çalışmaya dahil olan miRNA sayısını oldukça azaltmaktadır. Bu sorunların varlığına dikkat çeken ve yine sıralama tabanlı meta-analiz yaklaşımları ile miRNA mikrodizin verilerini bir araya getiren iki adet akciğer kanseri çalışması bulunmaktadır (88, 89).

Hormon reseptör statülerine (ER, PR, HER2) özgü meta-miRNA'lar

Meta-analiz çalışması sonucunda hormon reseptör statülerine göre elde edilen listelerden ER ve HER2 için **sonuç sıralama değerine** göre ilk 5 miRNA'nın (Çizelge 5.1 ve Çizelge 5.3) ifade farklılıklarının bağımsız meme tümör örnekleri kullanılarak (Çizelge 4.5) eş-zamanlı PZR yöntemi ile araştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç alınamamıştır (Şekil 5.18 ve Şekil 5.19).

Ancak literatür incelendiğinde, çalışmamız ile paralel birçok sonuç görülmektedir. Iorio ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada ER ve PR statüleri için verilen belirteç adayları listelerinde, meta-analizden elde edilen listede ilk 30 içerisinde olan birçok miRNA (hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-26a, hsa-miR-29b, hsa-miR-30b) bulunmaktadır (57). 2007 yılında yapılan bir çalışmada ER statüsünde meta-analizden elde edilen listede ilk 20 içerisinde olan 5 tane miRNA (hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-30a-5p, hsa-let-7a, hsa-miR-93, hsa-miR-199a*) belirteç adayları olarak tespit edilmiştir (90). Lowery ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HER2 statüsü için belirteç adayları miRNA listesinde bulunan hsa-miR-302c'nin, meta-analiz sonucu elde edilen meta-miRNA listesinde 7. sırada bulunduğu görülürken (60), başka bir çalışmada ise ER statüsü için belirteç adayları listesinde bulunan hsa-miR-491, hsa-let-7a ve hsa-miR-452 meta-analiz sonucu elde edilen listede 7, 8 ve 9. sırada bulunmaktadır (91).

Moleküler alt tiplere özgü meta-miRNA'lar

Meta-analiz çalışması sonucunda moleküler alt tip için de meta-miRNA listesi elde edilmiştir ancak kullanılan meme tümör örneklerinde moleküler alt tip bilgisi olmadığı için eş-zamanlı PZR ile onaylama çalışmasında bu miRNA'lar kullanılmamıştır.

Literatür incelendiğinde ise yine çalışmamızla paralel sonuçlar görülmektedir. Blenkiron ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada moleküler alt tipler için belirteç adayları miRNA listesinde bulunan hsa-let-7a, meta-analiz sonucunda elde edilen listede moleküler alt tip için ilk sıradaki meta-miRNA'dır (90). Enerly ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise alt tipleri birbirinden ayırdığı düşünülen belirteç adayları miRNA listesinde, meta-analiz çalışmasından elde edilen listede ilk 50 içerisinde olan miRNA'lar bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-517c, hsa-miR-519a'dır (62).

Tümör derecesine özgü meta-miRNA'lar

Meta-analiz çalışması sonucunda, meme kanserinin seyrinde ve tedavi sürecinde önemli yere sahip olan tümör derecelerini (tümör derecesi 1 (TD1), tümör derecesi 2 (TD2) ve tümör derecesi 3 (TD3)) birbirinden ayıran en kuvvetli ilk 6 adayın let-7 ailesi üyesi olan let-7c, let-7a, let-7f, let-7d, let-7e ve let-7i olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.2). Bağımsız tümör örnekleri (Çizelge 4.5) ile yaptığımız eş zamanlı PZR çalışmaları bu 6 miRNA'nın ifadesinin 1. ve 3. derece tümörler arasında farklılık gösterdiğini, tümör derecesi arttıkça miRNA'ların ifadesinde azalma olduğunu işaret etmektedir. Özellikle let-7a, let-7c ve let-7e ifadelerindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 5.20; n=21, $p \leq 0.05$). Bu altı miRNA ile yapılan diskriminant analiz sonuçları, miRNA'ların ifadelerinin bir arada tümör derecesi 3'ü hatasız sınıflandırabildiğini göstermiştir (Çizelge 5.23). Bulgularımıza paralel olarak Blenkiron ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada let-7 ailesinden let-7a, let-7b ve let-7c'nin tümör dereceleri için moleküler belirteç olabileceği ve tümör derecesi arttıkça bu miRNA'ların ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (90).

Tümör derecelerini birbirinden ayırabilen (tümör derecesine özgü) meta-miRNA'ların hedeflediği deneysel olarak onaylanmış gen listeleri incelendiğinde 251 genin (Çizelge 5.7) bu miRNA'ların ortak hedefleri olduğu gözlenmiştir. Yapılan yolak analizleri, bu ortak genlerin, *kanser*, *JAK/STAT*, *hücre döngüsü*, *hücre çoğalması* ve *apoptoz* gibi önemli yolaklarında anlamlı olarak rol aldığını ve yoğunlaştığını göstermiştir (Çizelge 5.8). Ortak hedef listelerinden elde edilen bu anlamlı sonuçlar aday miRNA'ların kanserin gelişimindeki rollerinin önemine dikkat çekmektedir. miRNA'ların hedeflerinin 3' UTR bölgelerine bağlanarak hedeflerini mRNA ya da protein seviyesinde baskıladığı sürecinden yola çıkarak her zaman olmasa da çoğunlukla ifadesi azalan miRNA'ların hedeflerinin ifadesinin artması beklenebilir. Hedeflerinin pek çoğu kanserleşme yolağında yer alan let-7 ailesinin ifadesinin tümör derecesi arttıkça azalması, kanser yolağındaki genlerin ifadelerinin artışına sebep olarak tümörleri dediferensiyasyona götürme olasılığını akla getirmektedir. Hedef gen listesinde yer alan CEBPA ve bu genin hedeflediği E2F, IL6 ve MYC genlerinin hücre diferensiyasyonunu bloke ederek hücreleri TD3'te olduğu gibi dediferensiyasyon durumuna sürükledikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (92).

Let-7 ailesine ek olarak tümör örnekleri ile yaptığımız deneylerde tümör derecesini birbirinden ayıran meta-miRNA listesinde ilk 20 arasında yer alan miR-30a-3p ve miR-

30a-5p'nin (14. ve 8. sırada), tümör derecesi 1 ve 2'yi birbirinden anlamlı olarak ayırdığı bulunmuştur ($p < 0.01$). Tümör derecesi ile doğru orantılı olarak derece arttıkça bu iki miRNA'nın ifadesinin de arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.22).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar gen ifade profilleri ile tanımlanan tümör derecesi ölçüsünün (Genomic grade index, GGI) histolojik tümör derecesine (Histologic grade index, HGI) oranla klinikte daha açıklayıcı olduğunu göstermektedir (16). Bu doğrultuda yapılan tümör derecesine özgü miRNA belirteç çalışmaları, histolojik TD1 ve TD3 arasında farklılık gösteren hsa-miR-93, hsa-miR-423, hsa-miR-25, hsa-miR-106b ve hsa-miR-345'in önemli belirteçler olduğuna dikkat çekmektedir. Bu miRNA'lar çalışmamızda elde edilen meta-miRNA listesinde ilk 50 miRNA arasında yer almaktadır (91). Ayrıca aynı çalışmada genomik derece indeksine bakıldığında let-7i, hsa-miR-379, hsa-miR-423 ve hsa-miR-422a yüksek ve düşük genomik derece indeksi arasında anlamlı olarak farklılık göstermiştir ve yine bu miRNA'lar bu çalışmada ortaya çıkartılan meta-miRNA listeleri ile uyumludurlar (91).

Bu çalışma süresince tasarlanmış ve kodlanmış olan meta-analiz yöntemi ile biyoinformatik olarak belirlenen tümör derecesine özgü miRNA belirteçlerinin deneysel olarak bağımsız tümör örneklerinde doğrulanabilir ve literatürde konuya özgü yapılan çalışmalar ile kıyaslanabilir olması hem tasarladığımız meta-analiz yönteminin hem de miRNA belirteçlerinin doğruluğunu göstermesi açısından önem taşımaktadır.

➤ **ER, PR, HER2, moleküler alt tip ve tümör derecesi için bahsi geçen miRNA'ların meta-analiz çalışmamızda meta-miRNA listelerinde ilk sıralarda olması çalışmamızdaki meta-miRNA belirteç adaylarını doğrulamaktadır ve aynı zamanda listede üst sıralarda olan diğer adayların literatürde daha önce bahsedilmeyen yeni miRNA belirteç adayları olabileceğine dikkat çekmektedir.**

Meta-analiz sonucu bulunan tümör derecesine özgü meta-genler ve bu genlerin miRNA hedefleri ile karşılaştırılması

Bugüne kadar yapılan pek çok miRNA çalışmasında miRNA'ların meme kanserinin klinik özellikleri ile ilgili bağlantısı kurulmuş ve meme kanserinin gelişiminde, patojenitesinde önemli rolleri olduğu ortaya konmuştur. miRNA ve miRNA hedef mRNA'larının ilişkilendirildiği çok az çalışma bulunmakla birlikte miRNA-mRNA ilişkisinin ortak olarak çalışılmasının önemi de bu çalışmalar ile gösterilmiştir (90, 62, 93)

Bu çalışmada geliştirilen meta-analiz yaklaşımı hem meme kanserinin alt tiplerini ayırabilen miRNA'ları hem de mRNA'ları bulmak için bağımsız mikrodizin verilerine uygulanmıştır. Meta-analiz sonucu tümör dereceleri için belirteç adayı olarak belirlenen ve eş zamanlı PZR sonucunda da istatistiksel olarak anlamlı sonuç alınan meta-miRNA'ların (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a, hsa-let-7i) deneysel olarak onaylanmış hedefleri ile meta-analiz sonucu elde edilen meta-mRNA'lar kıyaslandığında 49 tane genin ortak olduğu bulunmuştur (Çizelge 5.17). Bu genler kanser (TGFB1, RASSF1, RUNX1, VEGFA, IGF1R, STAT3, TGFB3) ve TGF-beta (SKP1, TGFB1, RBL2, TGFB3) sinyal yolları gibi kanser oluşumunda ve gelişiminde önemli rollere sahip yollarda rol almaktadır (Çizelge 5.18). Belirteç adayı miRNA'ların ve mRNA'ların bağımsız çalışmalar kullanılarak elde edilmiş olması da ortak 49 genin stabil ve güvenilir belirteçler olma ihtimallerini arttırmakta dolayısı ile bu genleri hedefleyen miRNA'ların da meme kanseri gelişimdeki rollerini sağlamlaştırmaktadır.

49 genin 10 tanesi (Çizelge 4.7) ile bağımsız tümör örneklerinde eş zamanlı PZR reaksiyonları ile doğrulama çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve IGF1R, STAT3 ve ZEB2'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD1 örneklere göre azaldığı, STAT3'ün ifadesinin TD2 örneklerde TD1 örneklere göre azaldığı, TGFB1, IGF1R ve ZEB2'nin ifadesinin TD3 örneklerde TD2 örneklere göre azaldığı görülmüştür (Bölüm 5.6).

Eş zamanlı olarak bu 49 gen ile "BRB Array Tools" kullanılarak bağımsız çalışmalar ile yapılan biyoinformatik analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklılık gösterdiği tespit edilen genler arasında çalışmamızda eş-zamanlı PZR ile ifade analizi yapılmış olan genler vardır (E-MTAB-1006 çalışmasında; TGFB1, STAT3, VEGFA, ZEB2, IGF1R, GSE22219 çalışmasında; IGF1R, STMN1, RUNX1, TCF19). Bu genlerden eş-zamanlı PZR analizinde de istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren IGF1R ve STAT3 (Bölüm 5.6) bağımsız çalışmalarda da paralel ifade değişimi göstermiştir (Şekil 5.26 ve Şekil 5.27).

Aynı zamanda eş-zamanlı PZR ile incelenerek anlamlı sonuç alınamayan ve 49 genin içerisinde olup eş-zamanlı PZR ile ifade analizi yapılmayan genler aynı bağımsız çalışmalarda incelendiğinde TD3 örneklerde TD1 ve/veya TD2 örneklere göre artış gösteren genlerin bulunması dikkat çekicidir (Şekil 5.26 ve Şekil 5.27). 49 gen meta-analiz sonucu tümör dereceleri için belirteç adayı olarak belirlenen meta-miRNA'ların (hsa-let-7c, hsa-let-7a, hsa-let-7f, hsa-let-7d, hsa-let-7a, hsa-let-7i) deneysel olarak onaylanmış

hedefleri ile meta-analiz sonucu elde edilen meta-mRNA'ların ortaklarıdır. Eş-zamanlı PZR sonucunda bu miRNA'ların ifadesinde TD3 örneklerde TD1 örneklere göre azalma görülmüştür. Dolayısıyla bu miRNA'ların "mRNA yıkımı" şeklinde etki ettiği ve bunun sonucunda genlerin miRNA'larla ters orantılı olarak ifade gösterdiği öngörülebilir. 2010 yılında yapılan çalışmada Guo ve arkadaşları miRNA'ların protein yıkımına olan etkisinin çoğunlukla ($\geq 84\%$) mRNA yıkımı ile olacağını öne sürmüş ve miRNA'ların öncelikli hedeflerinin mRNA'lar olduğuna dikkat çekmiştir (94). Bahsi geçen çalışma ile paralel olarak, eş-zamanlı PZR sonuçları (Bölüm 5.6), biyoinformatik analizler (Bölüm 5.7) ve meta-analiz sonucu belirlenen belirteç adayı meta-miRNA'ların deneysel olarak onaylanmış hedefleri ile meta-mRNA'ların önemli yüzdelerle ortak olması (Bölüm 5.4), miRNA'ların transkriptom üzerinde de doğrudan etkili olduğunu doğrular niteliktedir.

Bu çalışma sonucunda;

- ANOVA temelli ve sıralama tabanlı bir meta-analiz programı geliştirilmiş ve meme kanserine özgü miRNA mikrodizin çalışmaları bir araya getirilmiştir. Meme kanseri histolojik ve moleküler alt tiplerini birbirinden ayırabilen, özellikle tümör derecesine özgü, aday miRNA imzaları belirlenmiştir.
- Literatür araştırmasından elde edilen bilgiler doğrultusunda meme kanseri miRNA mikrodizin verileri ilk defa bir meta-analiz yaklaşımı ile bir araya getirilmiştir.
- Meta-analiz yaklaşımı hem miRNA mikrodizin verilerine hem de mRNA mikrodizin verilerine uygulanmış ve her bir alt tip için (tümör derecesi, ER, PR, HER2 ve moleküler alt tip) aday meta-miRNA hedef genleri ile aday meta-mRNA'ların ortaklarının olduğu bulunmuştur.
- miRNA-mRNA ilişkisine dikkat çekilmiş ve miRNA'ların işlevlerini translasyonel baskılamamanın yanı sıra mRNA disregülasyonu ile gerçekleştirebileceğine dikkat çekilmiştir.
- Let-7 ailesi üyesi olan let-7c, let-7a, let-7f, let-7d, let-7e ve let-7i'nin tümör derecelerini birbirinden ayırabilen güçlü belirteçler olabileceği hem biyoinformatik hem de deneysel olarak gösterilmiştir. Diskriminant fonksiyon analizleri bu miRNA'ların birlikte tümör derecesi 3'ü 100%'lük bir verim ile tahmin edebildiğini göstermektedir.

İleride yapılması düşünülen çalışmalar;

- Aynı meta-analiz yöntemini karışıklıklara neden olabilen isimler yerine, dizi (sekans) bilgilerine ulaşılan veriler ile ***miRNA dizileri*** baz alınarak uygulamak. Analizde sekans bilgisini kullanmanın isimlendirme tutarsızlıklarından kaynaklanacak olası veri kaybını minimuma indireyeceği düşünülmektedir.
- Meta-analiz sonucu elde edilen meta-miRNA listelerinden daha fazla miRNA seçilerek ve daha geniş bir tümör paneli kullanılarak eş-zamanlı PZR yöntemi ile araştırmak.
- Meta-analiz sonucu elde edilen meta-mRNA listelerinin, belirteç adayı meta-miRNA'ların hedef genleri ile ortak elemanlarından daha fazla seçilerek ve daha geniş bir tümör paneli kullanılarak eş-zamanlı PZR yöntemi ile araştırmak.
- Meta-analiz yöntemini Excel eklentisi olarak yapılandırmak.
- Meta-analiz yaklaşımını meme kanseri hastalarından alınan kan örnekleri ile yapılmış miRNA mikrodizin verilerine uygulamak ve biyobelirteç adayı olarak belirlenmiş meta-miRNA'ları kan verisinde analiz etmek.

KAYNAKLAR

1 Oldenburg R, Meijers-Heijboer H, Cornelisse C, Devilee P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? Critical reviews in oncology/hematology. 2007;63(2):125-149.

2 <http://www.cancer.org>

3 Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. Breast cancer research : BCR. 2010;12(4):207

4 <http://www.breastcancer.org>

5 Medina D. Mammary developmental fate and breast cancer risk. Endocrine-related cancer. Sep 2005; 12(3):483-495.

6 Bertos NR, Park M. Breast cancer-one term, many entities? The Journal of clinical investigation. 2011;121(10):3789.

7 Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. Breast cancer research : BCR. 2005;7(4):143-148.

8 Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(6797):747-752.

9 Sørli T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Jul 8 2003;100(14):8418-8423.

10 Siziopikou KP. Ductal Carcinoma In Situ of the Breast: Current Concepts and Future Directions. Archives of pathology & laboratory medicine. 2013;137(4):462-466.

11 Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L. Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node

negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer*. 1995 Mar 15;75(6):1320-6.

12 Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, S ave-S oderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R, Reed R. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1992 Jul;10(7):1049-56.

13 Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001 Mar 15;344(11):783-92.

14 Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, Chan S, Grimes D, Ant on A, Lluch A, Kennedy J, O'Byrne K, Conte P, Green M, Ward C, Mayne K, Extra JM. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 1;23(19):4265-74.

15 den Hollander P, Savage MI, Brown PH. Targeted therapy for breast cancer prevention. *Frontiers in oncology*. 2013;3.

16 Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2006;98(4):262-272.

17 Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology*. 2007;8(5):R76.

18 Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research: BCR*. 2010;12(5):R68.

- 19 Perou CM, Børresen-Dale A-L. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(2).
- 20 Sørlie T, Wang Y, Xiao C, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*. 2006;7(1):127.
- 21 Haverty PM, Fridlyand J, Li L, et al. High-resolution genomic and expression analyses of copy number alterations in breast tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2008;47(6):530-542.
- 22 Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(16):5367-5374.
- 23 Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Research*. 2007;9(5):R65.
- 24 Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, et al. Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PloS one*. 2012;7(3):e31904.
- 25 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(5):843-854.
- 26 Wightman B, Bürglin T, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the *lin-14* 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes & development*. 1991;5(10):1813-1824.
- 27 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855-862.
- 28 Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-864.

- 29 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-906.
- 30 Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-89.
- 31 Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer science*. 2010;101(11):2309-2315.
- 32 Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-419.
- 33 Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(4):259-269.
- 34 Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-98.
- 35 Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal*. 2002;21(21):5875-5885.
- 36 Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363-366.
- 37 Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631-640.
- 38 Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer research*. 2005;65(9):3509-3512.
- 39 Czech B, Zhou R, Erlich Y, et al. Hierarchical Rules for Argonaute Loading in *Drosophila*. *Molecular cell*. 2009;36(3):445-456.

- 40 Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell*. 2010;38(3):323-332.
- 41 Yang J-S, Phillips MD, Betel D, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *Rna*. 2011;17(2):312-326.
- 42 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
- 43 Andorfer CA, Necela BM, Thompson EA, Perez EA. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Trends in molecular medicine*. 2011;17(6):313-319.
- 44 Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297(5589):2056-2060.
- 45 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(2):102-114.
- 46 Ambros V, Bartel B, Bartel DP, et al. A uniform system for microRNA annotation. *Rna*. 2003;9(3):277-279.
- 47 Griffiths-Jones S. The microRNA registry. *Nucleic acids research*. 2004;32(suppl 1):D109-D111.
- 48 <http://www.mirbase.org>
- 49 Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 2003;113(1):25-36.
- 50 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America. Mar 2 2004;101(9):2999-3004.

51 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*. 2006;6(11):857-866

52 Gaur A, Jewell DA, Liang Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer research*. Mar 15 2007;67(6):2456-2468.

53 Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Nov 26 2002;99(24):15524-15529.

54 Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. Jun 9 2005;435(7043):834-838

55 Xi Y, Nakajima G, Gavin E, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rna*. Oct 2007;13(10):1668-1674.

56 Li J, Smyth P, Flavin R, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC biotechnology*. 2007;7:36.

57 Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*. Aug 15 2005;65(16):7065-7070.

58 Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. Jan 10 2008;451(7175):147-152.

59 Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Sep 2 2008;105(35):13021-13026.

60 Lowery AJ, Miller N, Devaney A, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast cancer research: BCR*. 2009;11(3):R27.

61 Mattie MD, Benz CC, Bowers J, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular cancer*. 2006;5: 24.

62 Enerly E, Steinfeld I, Kleivi K, et al. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors. *PloS one*. 2011;6(2):e16915.

63 Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Feb 14 2006;103(7):2257-2261.

64 Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in cell biology*. 2008;18(10):505-516.

65 Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer. *The American journal of pathology*. 2010;176(3):1058-106

66 O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(2):201.

67 Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell* 2006;124:1111-1115.

68 Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 2007;131:1109-1123

69 Dangli-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, Hammond SM, Minn AJ, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J* 2009;28:347-358.

70 Küçük hüseyin Ö, Öztürk O. miRNAlar ve Meme Kanserindeki Etkileri. *Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2013;3(5).

71 Yulug IG, Gur-Dedeoglu B. Functional genomics in translational cancer research: focus on breast cancer. *Briefings in functional genomics & proteomics*. Jan 2008;7(1):1-7.

72 Gershon D. Microarray technology: an array of opportunities. *Nature*. 2002;416(6883):885-891.

73 Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 2003 Feb;31(4):e15.

74 Russell S, Meadows, LA, Russell, RR. *Microarray Technology in Practice*. Russell S, Meadows, LA., Russell, RR., editor. Cambridge, UK.: Academic Press; 2009.

75 Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nature genetics*. 2001;29(4):365-371.

76 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>

77 <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>

78 Normand S-LT. Tutorial in biostatistics meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in medicine*. 1999;18(3):321-359.

79 Phan JH, Young AN, Wang MD. Robust microarray meta-analysis identifies differentially expressed genes for clinical prediction. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:989637.

- 80 Smith D, Sætrom P, Snøve O, et al. Meta-analysis of breast cancer microarray studies in conjunction with conserved cis-elements suggest patterns for coordinate regulation. *BMC bioinformatics*. 2008;9(1):63.
- 81 Thomassen M, Tan Q, Kruse TA. Gene expression meta-analysis identifies metastatic pathways and transcription factors in breast cancer. *BMC cancer*. 2008;8: 394.
- 82 Dweep H., Sticht, C., Pandey, P., Gretz, N. 2011. “ miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes”, *Journal of Biomedical Informatics*, 44: 839-7.
- 83 Oliveros, J.C. 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- 84 http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
- 85 <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>
- 86 Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*. 1947;18(1):50-60.
- 87 Kolde R, Laur S, Adler P, Vilo J. Robust rank aggregation for gene list integration and meta-analysis. *Bioinformatics*. 2012;28(4):573-580.
- 88 Vosa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. Dec 6 2012.
- 89 Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31(1):54
- 90 Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome biology*. 2007;8(10):R214.

91 Rothe F, Ignatiadis M, Chaboteaux C, et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PloS one*. 2011;6(6):e20980.

92 Gery S, Tanosaki S, Bose S, Bose N, Vadgama J, Koeffler HP. Down-regulation and growth inhibitory role of C/EBP α in breast cancer. *Clinical cancer research*. 2005;11(9):3184-3190.

93 Buffa FM, Camps C, Winchester L, et al. microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer research*. 2011;71(17):5635-5645.

94 Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-840.

EKLER

EK1: Meta-Analiz Kodu

```
clear
delete sonuclar.xlsx
clc
% Sonucların saklanacağı hücre grubu
% sütunlar sırayla ER, GRADE, HER2, SUBTYPE, PR olacak
R={};

dosyano=0;

%Dosya zorunlulukları
% Data dosyasının ilk sütununda Mirna olmalı
% patoloji dosyası
% data dosyasında boş satır olmamalı

while 1

    dosyano = dosyano+1;
    R{dosyano,1,1}=' ';
    R{dosyano,1,2}='ER';
    R{dosyano,1,3}='GRADE';
    R{dosyano,1,4}='HER2';
    R{dosyano,1,5}='SUBTYPE';
    R{dosyano,1,6}='PR';

    fdata=input('Data dosyasinin adi : ','s');
    while (isempty(dir(fdata)))
        disp('Data dosyasi bulunamadi');
        fdata=input('Data dosyasinin adi : ','s');
    end

    fpato=input('Patoloji dosyasinin adi : ','s');
    while (isempty(dir(fpato)))
        disp('Patoloji dosyasi bulunamadi');
        fpato=input('Patoloji dosyasinin adi : ','s');
    end

    [pat3num,pat3txt,pat3raw]=xlsread(fpato);
    [data3num,data3txt,data3raw]=xlsread(fdata);

    %raw dosyasının ilk satırı başlık, ilk sütunu başlık olmalıdır
    %excel dosyasi MIRNA'ya gore kucukten buyuge sirali olmalı

    %data dosyasındaki aynı satırlar birleştirilecek
    say=1;
    %[sat sut]=size(data3raw);
    x1=2;
    x2=3;
    while 1
        if (x2>size(data3raw,1))
```

```

        break;
    end
    if strcmp(data3raw{x2,1},data3raw{x1,1})==1
        for j=2:size(data3raw,2)
            data3raw{x1,j}=data3raw{x1,j}+data3raw{x2,j};
        end
        say=say+1;
        data3raw(x2,:)=[];

    else
        if say~=1
            for j=2:size(data3raw,2)
                data3raw{x1,j}=data3raw{x1,j}/say;
            end
            say=1;
        end
        x1=x2;
        x2=x2+1;
        if (x2>size(data3raw,1))
            break;
        end
    end
end
if say~=1
    for j=2:size(data3raw,2)
        data3raw{x1,j}=data3raw{x1,j}/say;
    end
    say=1;
end

% birleştirme işlemi sonu
% veriler hazır

for i=2:size(pat3raw,1)

    if strcmp(pat3raw{i,1},'ER')
        sutun=2;
    elseif strcmp(pat3raw{i,1},'GRADE')
        sutun=3;
    elseif strcmp(pat3raw{i,1},'HER2')
        sutun=4;
    elseif strcmp(pat3raw{i,1},'SUBTYPE')
        sutun=5;
    elseif strcmp(pat3raw{i,1},'PR')
        sutun=6;
    else
        disp('önemli bir hata. patoloji dosyasında ad
hatası');
        pause
        break
    end

    %NS var mı
    cnt=0;
    for k=2:size(pat3raw,2)

```

```

        if strcmp(pat3raw{i,k}, 'NS')==1
            cnt=1;
            break;
        end
    end
end
if cnt==0 %patoloji dosyasında NS YOK
    y=cell2mat(pat3raw(i,2:end)); %patoloji sıradaki
source name alındı

    for j=2:size(data3raw,1)
        x=cell2mat(data3raw(j,2:end));
        P=anova1(x,y,'off');
        if i==2
            R{dosyano,j,1}=data3raw{j,1};
        end
        R{dosyano,j,sutun}=P;
    end
else
    y=[];
    x=[];
    for j=2:size(data3raw,1)
        for k=2:size(pat3raw,2)
            end
            P=anova1(x,y,'off');
            if i==2
                R{dosyano,j,1}=data3raw{j,1};
            end
            R{dosyano,j,sutun}=P; %eski hali dosyano,j,i idi
        end
    end
end
disp(' ')

for x=1:length(fdata)
    if fdata(x)=='.'
        break
    end
end
txtdosya=strcat(fdata(1:x-1),'.txt');
fn = fopen(txtdosya,'wt');
for j=1:size(data3raw,1)
    for i=1:6 %size(pat3raw,1)
        if ~isempty(R{dosyano,j,i})
            fprintf(fn,'%s ',num2str(R{dosyano,j,i}));
        end
    end
    if ~isempty(R{dosyano,j,i})
        fprintf(fn,'\n');
    else
        break
    end
end
fclose(fn);

```

```

        sor=input('Başka dosya girmek istiyor musunuz (e/h) : ','s');
        if sor~='e'
            break;
        end
    end
end

% dosyano kadar dosya okundu, P'ler hesaplandı R kübik yapısında
% sırayla tutulmakta.

%disp(['dosya no = ' num2str(dosyano)])

for pti=2:6
    %if pti==2
        %ER hesaplaması
        temp={};
        mirnasay=0;
        for j=1:dosyano
            t={};
            say=2;
            while ~isempty(R{j,say,pti})
                t{say-1,1}=R{j,say,1};
                t{say-1,2}=R{j,say,pti};
                say=say+1;
                if say>length(R)
                    break;
                end
            end
            say=say-2;

            if say>0
                mirnasay=mirnasay+1;
                t=sortcell(t,2);
                if say>length(temp)
                    temp{say,1}=[];
                elseif say<length(temp)
                    t{length(temp),1}=[];
                end
                temp=[temp t];
            end
        end
        stemp={};
        %tüm ER'ler yan yana temp'e dizildi.
        stemp{1,1}='MIRNA';
        stemp{1,2}='Sıralamaların Ortalaması';
        stemp{1,3}='P Ortalaması';
        stemp{1,4}='Kaç Dosyada Bulundu?';
        sayac=1;
        for j=2:2:mirnasay*2-1
            for i=1:length(temp)
                if isempty(temp{i,j})
                    break;
                end
            end
            cnt=0;

```



```

for k=2:sayac
    if strcmp(stemp{k,1},temp{i,j})==1
        cnt=1;
        break;
    end
end
if cnt==0 %onceden bakılmamış mirna
    %en az iki kez kullanılmış mı?
    kulsay=1;
    toplam=temp{i,j+1};
    topsira=i;
    for jj=j+2:2:mirnasay*2
        for ii=1:length(temp)
            if strcmp(temp{i,j},temp{ii,jj})==1
                if isnan(temp{ii,jj+1})==1
                    break;
                end
                kulsay=kulsay+1;
                toplam=toplam+temp{ii,jj+1};
                topsira=topsira+ii;
                break;
            end
        end
    end
    if kulsay>1
        sayac=sayac+1;
        stemp{sayac,1}=temp{i,j};
        stemp{sayac,2}=topsira/kulsay;
        stemp{sayac,3}=toplam/kulsay; %p ort
        stemp{sayac,4}=kulsay;
    end
end
end
end
if pti==2
    sayfaadi='ER';
elseif pti==3
    sayfaadi='GRADE';
elseif pti==4
    sayfaadi='HER2';
elseif pti==5
    sayfaadi='SUBTYPE';
else
    sayfaadi='PR';
end
xlswrite('Sonuclar.xlsx',stemp,sayfaadi);
%end
end

```

EK2: Temsili miRNA Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	501 MFT14	Unknown	27.90			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	501 MFT14	Unknown	27.49			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	501 MFT16	Unknown	26.43			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	501 MFT16	Unknown	26.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	501 MFT21	Unknown	27.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	501 MFT21	Unknown	27.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	501 MFT41	Unknown	25.81			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	501 MFT41	Unknown	25.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	501 MFT85	Unknown	25.43			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	501 MFT85	Unknown	25.57			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	501 MFT88	Unknown	24.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	501 MFT88	Unknown	24.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	A13	501 MFT94	Unknown	25.14			
<input checked="" type="checkbox"/>	A14	501 MFT94	Unknown	24.91			
<input checked="" type="checkbox"/>	A15	501 MFT96	Unknown	24.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	A16	501 MFT96	Unknown	24.47			
<input checked="" type="checkbox"/>	A17	501 MFT113	Unknown	23.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	A18	501 MFT113	Unknown	23.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	A19	501 MFT116	Unknown	25.59			
<input checked="" type="checkbox"/>	A20	501 MFT116	Unknown	25.29			
<input checked="" type="checkbox"/>	A21	501 MFT124	Unknown	27.16			
<input checked="" type="checkbox"/>	A22	501 MFT124	Unknown	27.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	A23	501 MFT127	Unknown	25.62			
<input checked="" type="checkbox"/>	A24	501 MFT127	Unknown	25.95			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	501 MFT129	Unknown	26.82			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	501 MFT129	Unknown	26.46			

EK3: Temsili mRNA Eş-Zamanlı PZR Sonuçları

Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	MFT 14_1	Unknown	28.64			
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	MFT 14_1	Unknown	28.06			
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	MFT 16_1	Unknown	24.07			
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	MFT 16_1	Unknown	24.10			
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	MFT 21_1	Unknown	26.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	MFT 21_1	Unknown	26.73			
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	MFT 40_1	Unknown	26.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	MFT 40_1	Unknown	26.34			
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	MFT 41_1	Unknown	24.09			
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	MFT 41_1	Unknown	24.44			
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	MFT 49_1	Unknown	22.89			
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	MFT 49_1	Unknown	22.99			
<input checked="" type="checkbox"/>	A13	MFT 78_1	Unknown	25.98			
<input checked="" type="checkbox"/>	A14	MFT 78_1	Unknown	26.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	A15	MFT 85_1	Unknown	24.96			
<input checked="" type="checkbox"/>	A16	MFT 85_1	Unknown	25.97			
<input checked="" type="checkbox"/>	A17	MFT 88_1	Unknown	30.72			
<input checked="" type="checkbox"/>	A18	MFT 88_1	Unknown	31.48			
<input checked="" type="checkbox"/>	A19	MFT 94_1	Unknown	31.56			
<input checked="" type="checkbox"/>	A20	MFT 94_1	Unknown	32.15			
<input checked="" type="checkbox"/>	A21	MFT 95_1	Unknown	32.85			
<input checked="" type="checkbox"/>	A22	MFT 95_1	Unknown	32.31			
<input checked="" type="checkbox"/>	A23	MFT 96_1	Unknown	25.51			
<input checked="" type="checkbox"/>	A24	MFT 96_1	Unknown	25.66			
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	MFT 97_1	Unknown	28.20			
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	MFT 97_1	Unknown	28.53			

EK4: Etik Kurul Formu

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Meme kanserinin histolojik ve patolojik alt tiplerinin meta-analiz yöntemine dayalı miRNA imzaları ile sınıflandırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Bala Gür Dedeoğlu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	<input type="checkbox"/>			
	Yüksek Doz Araştırması	<input type="checkbox"/>			
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar/Vaka Kontrol Çalışması				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARAS 1 <input type="checkbox"/>	



04 Haziran 2012.

ASLI GİBİDİR

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>				
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>				
	ILAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
DİĞER:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:09-284-12	Tarih: 28 Mayıs 2012				
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri ile bilgilendirilmiş gönüllü olur formu incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Mehmet MELLİ				

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ahmet DEMİRKAZIK	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Toplantıda
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	Derste
Prof.Dr.Hakan UNCU	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Dr.Volkan KAVAS	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Sınavda
Gülşüm ASLAN	Arkeoloji	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Rahatsız

* :Toplantıda Bulunma



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yasemin Öztemur

Doğum Yeri: ANKARA

Doğum Tarihi: 06.01.1987

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Milli Eğitim Vakfı Özel Ankara Fen Lisesi (2005)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2011)

Yayınlar

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

8th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, 2013, “Let-7 Cluster As A Meta-Signature For Grade Classification In Breast Cancer”, Poster Sunum

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013, “Meme Kanserinin Patolojik Alt Tiplerinin Meta-Analiz Yöntemine Dayalı miRNA İmzaları ile Sınıflandırılması”, Poster Sunum

XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2013, “Polikistik over sendromunda kumulus ve granüloza hücrelerinin gen ifade profillerinin belirlenmesi”, Poster Sunum