



Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan sabit ciltte sırt yazısı bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak.



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;

Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**OVER KANSERİ AÇISINDAN DİSKORDANT OLAN
MONOZİGOTİK İKİZLERDE TÜM GENOM DÜZEYİNDE
TRANSKRİPTOMİK FARKLILIKLARIN
ARAŞTIRILMASI**

GÖZDE KURU TÜRKCAN

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Programında Doktora öğrencisi Gözde Kuru Türkcan tarafından Prof. Dr. Hülya Yazıcı'nın danışmanlığında hazırlanan "Over Kanseri Açısından Diskordant Olan Monozigotik İkizlerde Tüm Genom Düzeyinde Transkriptomik Farklılıkların Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından . . / . /201. . tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Ünvanı Adı Soyadı

Üniversite, Fakülte

Anabilim Dalı

Jüri-Danışman

Ünvanı Adı Soyadı,

Üniversite, Fakülte

Anabilim Dalı

Jüri

Ünvanı Adı Soyadı

Üniversite, Fakülte

Anabilim Dalı

Jüri

Ünvanı Adı Soyadı

Üniversite, Fakülte

Anabilim Dalı

Jüri

Ünvanı Adı Soyadı

Üniversite, Fakülte

Anabilim Dalı

BEYAN

İTHAF

Canım kızım Derin'e ve Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve akademik hayatım boyunca yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen tez danışmanım, sayın hocam *Prof. Dr. Hülya Yazıcı*'ya

Temel Onkoloji ABD'de bulunan ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma,

“2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı” ile Doktora eğitimi sürecinde eğitimimi destekleyen *TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU (TÜBİTAK)*' na teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:34055



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Over Kanseri	4
2.1.1. Over Kanserinde Sınıflandırma	4
2.2. Over Kanserinde Genlerin Rolü	5
2.2.1. Yüksek Dereceli Seröz Over Karsinomunda <i>TP53</i>	5
2.2.2. Yüksek Dereceli Seröz Over Kanserinde <i>BRCA1</i> ve <i>BRCA2</i>	5
2.2.2.1. Kalıtsal Meme ve Over Kanseri Sendromu (HBOC)	7
2.2.2.2. Lynch Sendromu veya Kalıtsal Non-Polipozis Kolon Kanseri (HNPCC)	9
2.2.3. Yüksek Dereceli Seröz Over Kanserinde <i>CCNE1</i>	9
2.3. Over Kanserinde Epigenetik	10
2.3.1. Kodlamayan RNA'lar	12
2.3.1.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNA)	12
2.3.1.2. Kısa kodlamayan RNA'lar: miRNA ve siRNA	13
2.3.1.3. Kısa kodlamayan RNA'lar: Piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA)	16
2.4. RNA-Sekanslama (RNA-SEQ)	18
2.5. Monozigotik İkizler	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Çalışmada İncelenen Numunelere Ait Bilgiler	21
3.2. Kullanılan Kimsayasal Malzemeler ve KİT'ler	22
3.3. Kullanılan Cihazlar	22

3.4. Deneyisel Yöntemler.....	23
3.4.1. Örneklerin Hazırlanması.....	23
3.4.1.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu	23
3.4.1.2. Lenfositlerden Total RNA İzolasyonu	23
3.4.1.3. Parafin Bloktaki Dokudan (FFPE) Total RNA İzolasyonu.....	24
3.4.1.4. Örneklerin Kalite Ölçümleri	25
3.4.2. Total RNA'dan mRNA Eldesi	27
3.4.2.1. Total RNA'dan rRNA Uzaklaştırması	27
3.4.2.2. Örneklerin Kalite Ölçümleri	28
3.4.3. Kütüphane Hazırlanması.....	29
3.4.3.1. RNA Fragmentasyonu Edilmesi.....	29
3.4.3.2. cDNA Sentezi	30
3.4.3.3. Adaptörlerin Bağlanması	31
3.4.3.4. cDNA Kütüphanesinin PZR Aşaması.....	32
3.4.4. Transkriptom Dizileme	33
3.4.4.1. DNB (DNA Nanoball) Yapımı	33
3.4.4.2. DNB'lerin Yüklmesi	35
3.5. Biyoinformatik Analizler	36
3.5.1. Kalite Kontrol	36
3.5.2. Hizalama İşlemi	36
3.5.3. Transkript Tanımlama Akışı	37
3.5.4. Ekspresyon seviyesi tayini	37
3.5.5. Annotasyon ve Filtreleme	37
3.5.6. Gen Ontoloji (GO) ve Yolak Analizi (KEGG)	37
3.5.7. LncRNA Analizi	37
3.5.8. Füzyon Gen Analizi	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Verilerin Ön İşlem Sonrası Kalite Sonuçları	39
4.2. Genom Hizalama.....	40
4.3. Ekspresyon Analizi Sonuçları.....	42
4.4. GO Analiz Sonuçları.....	63
4.5. KEGG Analiz Sonuçları.....	70
4.6. Füzyon Gen Analizi Sonuçları.....	75

5. TARTIŞMA	77
KAYNAKLAR	88
ETİK KURUL KARARI	96
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	97
ÖZGEÇMİŞ	98



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bazı özellikleri açısından miRNA ve siRNA'nın rolleri [85].....	15
Tablo 3-1:İncelenen Örnekler ve Örnek Kodları	21
Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlere ait bilgiler	22
Tablo 3-3: Çalışmada kullanılan cihazlara ait bilgiler	22
Tablo 3-4: RNA/Prob Hibridizasyonu Reaksiyon Koşulları.....	27
Tablo 3-5:RNaz H Digestion Reaksiyon Koşulları.....	27
Tablo 3-6: DNaz I Digestion Reaksiyon Koşulları	28
Tablo 3-7: RNA Fragmentasyonu İçin Önerilen Koşullar	29
Tablo 3-8: Ters Transkripsiyon Reaksiyon Koşulları.....	30
Tablo 3-9: İkinci Zincir Sentez Reaksiyon Koşulları.....	30
Tablo 3-10: Uç Onarım ve A-kuyruklama (PolyA Tailing) Reaksiyonu Koşulları	31
Tablo 3-11: Adaptör Ligasyonu için Reaksiyon Koşulları	31
Tablo 3-12 : PZR Amplifikasyonu İçin Reaksiyon Koşulları	32
Tablo 3-13: Tek Zincir Sirkülarizasyon için Reaksiyon Koşulları	33
Tablo 3-14: Make DNB Reaksiyon Karışımı I	34
Tablo 3-15: DNB Reaksiyon Koşulları I	34
Tablo 3-16: Make DNB Reaksiyon Karışımı II	34
Tablo 3-17: DNB Reaksiyon Koşulları II	35
Tablo 4-1: Vakalara ait Klinik Bilgiler	38
Tablo 4-2: Total RNA kalite ölçüm sonuçları.....	39
Tablo 4-3: Filtreleme Sonuç tablosu.....	40
Tablo 4-4: Genom hizalama sonuçları	40
Tablo 4-5: Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu artan protein kodlayan genler (Grup 1).....	42
Tablo 4-6: Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu artan LncRNA'lar (Grup 1) (*Novel transkript)	45
Tablo 4-7:Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu azalan protein kodlayan genler (Grup 1).....	46
Tablo 4-8: Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu azalan LncRNA'lar (* Novel transkript) (Grup 1)	50

Tablo 4-9: Sağlıklı PK örneklerine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu artan protein kodlayan genler (*Novel genler) (Grup 2).....	52
Tablo 4-10: Sağlıklı PK örneğine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu artan lncRNA'lar (*Novel transkript) (Grup 2).....	53
Tablo 4-11: Sağlıklı PK örneklerine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu azalan protein kodlayan genler (Grup 2)	54
Tablo 4-12: Sağlıklı PK örneklerine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu azalan lncRNA'lar (*Novel transkript) (Grup 2).....	55
Tablo 4-13 : Hastanın periferik kanına göre dokusunda ekspresyonu yüksek görünen kodlayan genler (Grup 3).....	56
Tablo 4-14: Hastanın kanına göre dokusunda ekspresyonu yüksek görünen lncRNA'lar (*Novel transkript) (Grup 3)	58
Tablo 4-15: Hastanın kanına göre dokusunda ekspresyonu düşük görünen kodlayan genler.....	60
Tablo 4-16: Hastanın kanına göre dokusunda ekspresyonu düşük görünen lncRNA'lar (*Novel transkript).....	61
Tablo 4-17: 3 karşılaştırma sonucunda ortak ekspresyon değişim gösteren miRNA'lar	62
Tablo 4-18: Tümör dokusunda ekspresyonu yüksek olan genlerin GO analiz sonucu	64
Tablo 4-19: Tümör dokusunda ekspresyonu düşük olan genlerin GO analiz sonucu	66
Tablo 4-20: Hastanın kanında ekspresyonu yüksek olan genlerin GO analiz sonucu	69
Tablo 4-21: Ekspresyonu değişen genlerin KEGG sonuçları	70
Tablo 4-22: Füzyon Gen Analizi Sonuçları	76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Yüksek dereceli seröz over karsinomlarının (HGSOC'ler) patolojik ve genomik özellikleri [54].....	10
Şekil 2-2: RNAi mekanizmasında rol alan miRNA ve siRNA'ların sentez ve etki yolları[84]15	
Şekil 2-3: piRNA biyosentez mekanizması [86].....	17
Şekil 2-4: piRNA/piwi protein işlevi [86].....	18
Şekil 3-1:Çalışmada incelenen aile bireylerinin aile ağacındaki gösterimi	22
Şekil 3-2: “Agilent 2100 Biyoanalizör” uygulamasında kullanılan araçlar	26
Şekil 3-3:Transkriptom Sekanslama Şematik Gösterimi	29
Şekil 4-1: Hizalama sonucu kalite değerleri	40
Şekil 4-2: Örnekler arası korelasyon.....	41
Şekil 4-3: Diferansiyel Ekspresyon Dağılımı Maplot (sol) ve Volcano (sağ) Grafikleri.....	41
Şekil 4-4: Oksidatif Fosforilasyon Yolağı (KEGG).....	72
Şekil 4-5: MAPK Sinyal Yolağı (KEGG).....	73
Şekil 4-6: TNF Sinyal Yolağı (KEGG).....	73
Şekil 4-7: NF Kappa B Sinyal Yolağı (KEGG).....	74
Şekil 4-8: Kanserde Kolin Metabolizması (KEGG)	74
Şekil 4-9: Interlökin-17 (IL-17) Sinyal Yolağı (KEGG)	75

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

OK: Over Kanseri
EOK: Epitelyal Over Kanseri
TAH: Total Abdominal Histerektomi
BSO: Bilateral Salpingooferektomi
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA: Ribo Nükleik Asit
mRNA: Mesajcı RNA
miRNA: Mikro RNA
ncRNA: Kodlamayan RNA
lncRNA: Uzun Kodlamayan RNA
snoRNA: Küçük Nükleolar RNA
piRNA: Piwi Etkileşimli RNA
mtDNA: Mitokondriyal DNA
HGSOC: Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri
TCGA: Kanser Genom Atlas Araştırması
DSB: Çift Zincir Kırıkları
NHEJ: Homolog Olmayan Uç Birleştirme
SSB: Tek Zincir Kırığı
HRD: Homolog Rekombinasyon Hasarı
FDA: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Kuruluşu
NCCN: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
MSI: Mikrosatellit İnstabilite
MMR: DNA Tamir Genleri
HBOC: Kalıtsal Meme-Over Kanseri
TNBC: Triple Negatif Meme Kanseri
HNPCC: Kalıtsal Non-Polipozis Kolon Kanseri
STIC: Seröz Tubal İntraepitelyal Karsinom
RNA-SEQ: RNA Dizileme

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

MZ: Monozigotik

cDNA: Komplementer DNA

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

FFPE: Formalinle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü Doku

RIN: RNA Bütünlük Değeri

NGS: Yeni Nesil Dizileme

RT: Ters Transkripsiyon

DNB: DNA Nanoball

IGV: Integrative Genomics Viewer/ Bütünleştirici Genomik Görüntüleyici

GO: Gen Ontoloji

KEGG: Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi

Fc: Değişim Katsayısı

FDR: Yanlış Eşleşme Oranı

PDAC: Pankreatik Duktal Adenokarsinom

EMT: Epitel-Mezenkimal Geçiş

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

HNNSC: Baş-Boyun Yassı Hücreli Karsinom

NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

ÖZET

Kuru Türkcan, Gözde (2021). Over Kanseri Açısından Diskordant Olan Monozigotik İkizlerde Tüm Genom Düzeyinde Transkriptomik Farklılıkların Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Over kanseri, jinekolojik kanser türleri arasında malignite ve mortalite oranı yüksek olan ve en sık görülen ikinci kanserdir. Over kanserinin alt tipleri arasında en yaygın ve agresif nitelik taşıyan epitelyal over kanserinde (EOK) geç tanı ve erken aşamada kemoterapiye direncin gelişmesi bu hastalığın tedavisinin önündeki en büyük engeli oluşturmaktadır. Rutin tedavi protokollerinin ileri evre vakalarda etkili olmaması EOK’da, kişiselleştirilmiş tedavilerin önemini vurgulamaktadır. Over kanserinin %15-25’i kalıtsal nitelik taşımaktadır. Son yıllarda özellikle germline ve somatik BRCA1/2 gen mutasyonuna sahip olan over kanserli hastalarda PARP inhibitörlerinin kullanımı gündeme gelmiştir. BRCA1/2 gen mutasyonları sağlıklı bireylerde kanser riskini arttırmakla beraber tek başına kanserin gelişiminde yeterli olmadığı da bilinmektedir. Doğada neredeyse birbiri ile aynı genotipe sahip iki canlı olan monozigotik (MZ) ikizler dahi yaşam boyu farklı fenotipik özellikler geliştirilebilmektedir. MZ ikizlerdeki fenotipik farklılıklara neden olan bu değişiklikler, kanserin gelişiminde ilave mekanizmaların rol oynadığını ve farklı değişikliklere odaklanmamız gerektiğini düşündürmektedir. Bu bağlamda söz konusu tez çalışmasında yeni nesil dizileme teknolojisi kullanarak genom düzeyinde transkripte olan tüm RNA molekülleri over kanseri açısından diskordant olan monozigotik ikizler ile BRCA1 mutasyon taşıyıcısı olan diğer sağlıklı kardeşin periferik kan ve over dokuları karşılaştırılarak incelenmiştir. BRCA1 mutasyonu taşıyan ancak sadece birinin over kanserine yakalandığı tespit edilen yüksek riskli ailede over kanseri gelişiminin altında yatan genetik farklılıklar tüm genomda transkripte olan moleküller incelenerek araştırılmıştır. Over kanserine sahip MZ ikiz, sağlıklı ikizi ve sağlıklı kardeşin over dokuları ve periferik kan örneklerinden elde edilen 6 örneğe ait total RNA’nın, BGI-Seq500 NGS platformunda RNA-Seq dizileme işlemi ile yapılan transkriptomik analizi sonucunda, dokuda ve kanda sağlıklılara göre ekspresyon değişimi gösteren protein kodlayan genler, lncRNA’lar, öncül miRNA’lar ve füzyon transkriptler tespit edilmiştir. Yapılan analizde filtreleme işlemleri ve ekspresyon değişim katsayıları ($\log_2 Fc$) over kanseri için bilinen tümör markerları olan CA125 ve CA15-3 ekspresyon verilerine göre belirlenmiştir. Bu analize göre, 3 farklı grupta ekspresyon değişimi gösteren 66 protein kodlayan gen, 25 novel lncRNA, 9 miRNA ve 2 füzyon transkriptin ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlenmiş olup bu moleküllerin, epitelyal over kanseri ile ilişkili aday moleküller olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Monozigotik ikizler, Epitelyal over kanseri, RNA-Sekanslama, Transkriptom analizi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34055

ABSTRACT

Kuru Türkcan, G. (2021). Investigation of Transcriptomic Differences at Whole Genome Level in Monozygotic Twins Discordant in Terms of Ovarian Cancer. İstanbul University, Institute of Health Science, Basic Oncology Dept. Doctoral Thesis. İstanbul.

Ovarian cancer is the second most common type of gynecological cancer with a high rate of malignancy and mortality. The most significant barrier to treating epithelial ovarian cancer (EOC), the most common and aggressive subtype of ovarian cancer, is late diagnosis and the emergence of chemotherapy resistance in the early stages. The ineffectiveness of standard treatment protocols in advanced-stage cases highlights the value of individualized EOC treatment. 15-25% of ovarian cancer is inherited. PARP inhibitors have gained popularity in recent years, especially in patients with ovarian cancer who have germline and somatic BRCA1 / 2 gene mutations. Although BRCA1 / 2 gene mutations increase the risk of cancer in healthy people, it is well understood that mutations in these two genes are not only enough to cause cancer. Even monozygotic (MZ) twins, with almost the same genotype in nature, can develop different phenotypic characteristics throughout life. These changes, which result in phenotypic variations in MZ twins, indicate that additional mechanisms are involved in cancer development and that different changes should be studied. In this context, the peripheral blood and ovarian tissues of monozygotic twins who are discordant in terms of ovarian cancer and the other healthy sibling who is a BRCA1 mutation carrier were compared in this thesis study to analyze all RNA molecules transcribed at the genome level using next-generation sequencing technology. Through analyzing the molecules transcribed in the whole genome, the genetic variations underlying the development of ovarian cancer in a high-risk family bearing the BRCA1 mutation but only one of whom was found to have ovarian cancer were examined. As a result of the transcriptomic analysis of the total RNA of 6 samples obtained from the ovarian tissues and peripheral blood samples of MZ twin with ovarian cancer, healthy twin and healthy sibling, the protein encoding protein that shows expression changes in tissue and blood compared to healthy people genes, lncRNAs, precursor miRNAs and fusion transcripts have been identified. Filtering procedures and expression change coefficients ($\log_2 F_c$) were calculated based on the expression data of identified ovarian cancer tumor markers CA125 and CA15-3. According to this study the expression levels of 66 protein coding genes, 25 novel lncRNAs, 9 miRNAs, and 2 fusion transcripts were found to vary in three groups, and these molecules are thought to be candidate molecules associated with epithelial ovarian cancer

Key Words: Monozygotic Twins, Epithelial Ovarian Cancer, RNA Sequence Analysis, Gene Expression Profiling

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 34055

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında her yıl ortalama 295.000'den fazla kadın over kanseri (OK) tanısı almakta ve kadınların yaklaşık 185.000'i hayatını bu hastalık nedeniyle kaybetmektedir. Türkiye'de ise 2018 verilerine göre, 3729 kadının over kanseri teşhisi aldığı ve ortalama 2191 kadının over kanseri nedeniyle öldüğü bildirilmiş, 5 yıllık sağ kalım oranı ise %23,8 olarak açıklanmıştır. Kadınlarda en sık görülen kanser tiplerine bakıldığında over kanserinin Türkiye'de, Dünya ile uyumlu olarak 7. sırada yer aldığı görülmektedir. Bu veriler over kanserinin, jinekolojik kanserden ölüm oranının önemli bir nedeni olduğunu ortaya koymaktadır. Over kanseri, jinekolojik kanser türleri arasında ise malignite ve mortalite oranı yüksek olan ve en sık görülen ikinci kanserdir [1]. Geç tanı ve kemoterapiye direncin gelişmesi başarılı bir over kanser tedavisinin önündeki engellerin başında gelmektedir. Spesifik olmayan klinik semptomlar ve erken biyobelirteçlerin yokluğu nedeniyle, over kanseri genellikle ileri evrelerde (evre III ve evre IV) teşhis edilir. Epitelyal over kanseri (EOK), vakaların % 90'ından fazlasını oluşturur ve en yüksek ölüm oranına sahiptir. EOK'da high grade seröz tip en sık karşılaşılan (%70) türüdür. Over kanserinin standart tedavisi, tümörün çıkarıldığı cerrahi operasyon ve kemoterapi şeklindedir, ancak ileri evre hastaların %70'i tedaviden sonraki 15 ay içinde kemoterapiye direnç ve nüks geliştirmektedir [2]. Mevcut over kanseri biyobelirteçleri CA-125 ve CA15-3 (kanseri antijen-125 ve 15-3), klinik olarak teşhis edilen hastalık için belirli bir hassasiyete sahiptir, ancak çok azı erken evre hastalık tanısında ve malign oluşumların benign oluşumlardan ayrılmasında yüksek duyarlılığa sahiptir [3]. Asemptomatik kadınlarda, over kanseri için yeterli tarama testi yoktur, çünkü serum CA-125 konsantrasyonunun, transvajinal ultrasonun veya her ikisinin ölçümüne dayanan stratejiler, bu hastalığın erken evresinde tespiti için yeterince duyarlı değildir [4]. CA125 ve CA153, dokuda protein seviyesi çok yükseldikten sonra kanda tespit edilen markerlar oldukları için erken evre tümör markerı olarak kullanılamamaktadır. Bu markerlara alternatif daha erken evrede tümör tespiti yapan biyolojik belirteç niteliği taşıyan moleküllere ihtiyaç vardır.

Sunulan tez çalışmasında over kanseri açısından diskordant olan monozigotik ikiz kardeşlerin over doku örnekleri ile periferik kan örnekleri ve yine aile üyelerinden taşıdığı *BRCA1* gen mutasyonu sebebi ile profilaktik olarak TAH+BSO geçirmiş olan

kişiyeye ait over dokusu ve periferik kan örneklerinde RNASeq analizi ile farklı genlerin ve farklı RNA moleküllerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve birbiri ile karşılaştırılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan vaka sayısı az olduğundan over kanserini erken düzeyde periferik kandan saptayan moleküllerin belirlenmesi ve rutin uygulamada var olanlarla karşılaştırmanın yapılabilmesi hedeflendiğinden, RNASeq değerlendirmesi yaparken hali hazırda rutin uygulamalarda kullanılan CA125 ve CA153'ün ekspresyon seviyesine yakın olan ve sadece tümöre spesifik erken tanı markerı olabilecek moleküller değerlendirilmiştir. Bir başka değışle, analiz aşamasında dokulardaki CA125 ve CA153'ün ekspresyon seviyeleri bir anlamda kontrol değeri olarak kabul edilerek doku ve periferik kanda saptanan farklı moleküllerin ekspresyon seviyeleri filtrelenmiş ve farklılıklar bu şekilde ortaya koyulmuştur.

Tez çalışması kapsamında incelenen aile ve bu aileye mensup vakalara ait grubumuzun yaptığı önceki çalışmalarda genom metilasyon profilleri [5] ve miRNA profilleri [6] periferik kanda incelenmiş, 3.ayak olan gen ekspresyon düzeyleri de bu tez projesi ile tamamlanmıştır. Söz konusu tez çalışması önceki 2 çalışmayı konfirme ve destekleyen bir çalışma olmakla beraber, sağlıklı over dokuları ile over tümör dokusundaki transkriptomik farklılıkları mRNA ekspresyon datası, lncRNA ve füzyon gen datası olmak üzere farklı açılardan incelenildiğı çok fazla verisi olan bir çalışmadır.

Tez çalışması kapsamında over kanserine özgü belirlenecek olan moleküllerden periferik kanda tespit edilenlerin hastalığın erken tanısında ve hastalığın takibinde; dokuda tespit edilen moleküllerin ise tedavi planlamasında ve takibinde kullanılabileceğı düşünülmektedir. Literatürde ve klinikte, over kanseri taramasında, hastalığın erken evre teşhisinde, tedavi planlamasında ve tedavi takibinde, onaylanmış yüksek hassasiyete sahip ve yalnızca maligniteyi tespit edebilecek bir klinik testin bulunmaması, bu noktadaki boşlukları doldurması açısından da çalışmamızı önemli ve değeri kılmaktadır.

Genomik ve transkriptomik çalışmalar, şu anda büyük ölçüde *p53* ve *BRCA1/2* ile sınırlandırılmış sınırlı sayıda öncü (driver) mutasyonu tanımlamayı başarmış olsa da tedaviyi belirlemek için kullanılabilecek öngörücü belirteçleri tanımlama konusunda genel olarak başarısız olmuştur [7]. Bu nedenle, over kanseri için yeni tanısal biyolojik belirteçlerin tanımlanması oldukça zordur ancak bir gerekliliktir. Projemizde, *BRCA1* gen mutasyonu taşıyıcısı olan ancak sadece birinin over kanserine yakalandığı ve

dolayısıyla fenotipik olarak diskordant monozigotik kardeşlerin over dokularına ve periferik kan dokularına ait RNA örnekleri yeni nesil dizilime teknolojisi kullanılarak transkriptom sekanslama yöntemi ile genomda ifade edilen tüm RNA moleküllerinin miktarı ve çeşidi eş zamanlı olarak araştırılmış ve fenotipik farklılığın genetik nedenlerinin ne olduğu sorusuna cevap aranmıştır. Over kanseri açısından fenotipik olarak diskordant olan monozigotik ikiz kardeşlerin sonuçları, aynı ailede *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı olup sağlıklı olan diğer kardeşle de karşılaştırılarak özellikle yüksek riskli over kanserinin etiyolojisinde önemli olan genler belirlenmeye çalışılmıştır. Burada amaç, elde edilecek sonuçlar doğrultusunda kalıtsal over kanseri gelişiminde rol oynayan transkriptom profillerinin genom düzeyinde belirlenerek, over kanseri oluşumunun altında yatan genetik süreçlerin, rol oynayan yolların ve eksprese olan moleküllerin birbirleri ile nasıl bir iletişim içinde olduklarının ortaya çıkarılmasına ve buna bağlı olarak yeni tanı ve tedavi protokollerinin geliştirmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Kanseri

Over kanseri, tüm jinekolojik kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip ikinci kanser tipidir [8]. Epitelyal over kanseri (EOK) en yaygın türüdür [9]. Genel olarak, EOK hastalarının çoğu, erken evre EOK'nin spesifik olmayan semptom karakteristiği ve mevcut EOK'ye özgü biyobelirteçlerinin bulunmaması nedeniyle ileri evrede (Evre III veya IV) teşhis edilir. Standart EOK tedavisi, debulking cerrahisini takiben platin bazlı kimyasal tedaviden oluşur [10, 11]. İlk tümör yanıtı sıklıkla ümit verici olsa da, ne yazık ki tümörler kemo-direnç nedeniyle hızla nükseder. Edinilen kemo-direnç, EOK tedavisinde göz korkutucu bir sorundur [12]. Bu nedenle, erken evre hastalığı saptayabilen kansere özgü yeni biyobelirteçlerin yanı sıra, EOK nüksüne karşı etkili terapötik ajanların belirlenmesi, EOK tedavisi için hayati önem taşır [13].

2.1.1. Over Kanserinde Sınıflandırma

Over kanseri, yumurtalıkları içeren çeşitli tümörler için spesifik olmayan bir terimdir. Over kanserleri üç büyük gruba ayrılabilir: epitel, germ hücresi ve özelleşmiş stromal hücre tümörleri. Over kanserlerinin büyük çoğunluğu epitelyal over kanserleridir (EOK'ler). EOK ayrıca iki ana gruba ayrılan çeşitli histolojik alt tiplere ayrılabilir: Tip I ve Tip II tümörler. Tip I tümörler, düşük dereceli seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli karsinomları içerir ve genellikle tanımlanabilir bir öncülde daha yavaş büyüme eğilimindedir. Bunun aksine, Tip II tümörler, yüksek dereceli ve hızla ilerleyen hastalıkla karakterize edilir. Yüksek dereceli seröz over karsinomu (HGSOC), tüm EOK'lerin neredeyse % 75'ini oluşturan en yaygın Tip II tümörüdür. Ne yazık ki, aynı zamanda en agresif olanlardan biridir. Şu anda HGSOC'nin erken tespiti için sağlam yöntemler bulunmamaktadır. Sonuç olarak, kadınların çoğu, kanser zaten periton boşluğu içinde diğer dokulara metastaz yaptığında teşhis edilir. Hastalık peritona yayılsa bile spesifik semptomların olmaması, gecikmiş tanıya ve zayıf hayatta kalma oranlarına katkıda bulunur [14].

2.2. Over Kanserinde Genlerin Rolü

2.2.1. Yüksek Dereceli Seröz Over Karsinomunda *TP53*

HGSOC'nin ayırt edici özelliklerinden biri, *TP53* tümör baskılayıcı genindeki mutasyonların evrensel varlığıdır [14-17]. *TP53* mutasyonu, fallop tüpü sekretuar hücrelerin dönüşümünde bilinen ilk moleküler olaydır ve erken tümör öncülerinde tanımlanabilir [18]. Son çalışmalar, *TP53* yanlış anlamalı (missense) mutasyonlarının stabilize edildiğini, ancak endojen doğal tip *TP53* kaybının olmadığını, ankrajdan bağımsız büyüme koşulları altında sekretuar hücre hayatta kalmasını ve hücre-hücre agregasyonunu desteklediğini göstermektedir. Bu mutant aracılı otokrin matriks birikimi, peritoneal yayılma için muhtemelen gerekli olan mezotelyal interkalasyon kapasitesine sahip hücre kümelerinin oluşumuna yol açar [19]. İlginç bir şekilde, R273H, R175H ve R248Q dahil olmak üzere en yaygın *TP53* yanlış anlamalı mutasyonlarının, mutasyona uğramış tam uzunlukta p53 mRNA'dan çevrilen çok sayıda ve yüksek miktarlarda daha kısa p53 protein izoformları ifade ettiği görülmektedir. $\Delta 160p53$ gibi bu daha kısa izoformlar, artmış survival, proliferasyon, adhezyon ve invazyon dahil olmak üzere mutant proteine özgü tüm fonksiyon kazanım özelliklerini sergiler [20]. Bu veriler, *TP53*'ün erken mutasyonunun HGSOC başlangıcı için gerekli olduğunu göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı, mutant p53, HGSOC'de çekici bir terapötik hedef olarak yeniden ortaya çıkmıştır [21].

2.2.2. Yüksek Dereceli Seröz Over Kanserinde *BRCA1* ve *BRCA2*

HGSOC gelişiminde gözlemlenen yüksek sıklıkta *TP53* mutasyonlarına rağmen, TCGA (Cancer Genome Atlas Research) verileri, *BRCA1* ve *BRCA2* haricinde diğer genlerdeki tekrarlayan mutasyonların nispeten nadir olduğunu düşündürmektedir [14]. *BRCA1* ve *BRCA2*, homolog rekombinasyon yoluyla DNA onarımını düzenleyerek genomun bütünlüğünü korumada kritik rol oynayan proteinlerdir. Homolog rekombinasyon, yüksek doğrulukta bir süreçtir ve onarımlar için bir şablon olarak kardeş kromatidi kullandığı için çift sarmallı kırılmaları (DSB'ler) onarmak için hatasız bir mekanizma olarak kabul edilir. Bu mekanizma, bir şablon olmadan basitçe DSB uçlarını bağlayan ve hataya daha yatkın olan homolog olmayan DNA uç birleştirme (NHEJ) olarak bilinen diğer ana yolun tersidir. Çift sarmallı DNA kırılmaları en sık DNA replikasyonu sırasında meydana gelir, özellikle replikasyon kompleksi tek sarmallı bir kırılma (SSB) ile karşılaştığında, sonuçta onarılmazsa genomik kararsızlığa

ve hücre ölümüne yol açar. *BRCA1* ve *BRCA2*'deki mutasyonlar, homolog rekombinasyon eksikliğine (HRD) neden olur, bu da hücrelerin DSB'yi onarmak için NHEJ yoluna çok daha fazla güvenmesine neden olur. BRCA genlerindeki germline ve somatik mutasyonlar tüm HGSOc'ların yaklaşık % 15-20'sini oluştursa da, BRCA ağındaki disfonksiyon ve homolog rekombinasyon, HGSOc'nin yaklaşık % 50'sinde homolog rekombinasyona dahil olan genlerdeki değişiklikleri barındıran daha yaygın görülmektedir [14, 16, 22] [23]. Örneğin, *BRCA1* promotörü yüksek oranda metillenmiş olabilir, bu da gen ekspresyonunun kaybına ve *BRCA1* mutant fenotipinin taklit edilmesine neden olabilir [14]. BRCA genlerine ek olarak, mutasyona uğradığında HRD'ye muhtemelen katkıda bulunan birkaç kalıtsal DNA onarım geni vardır. Bunlar Fanconi anemi kompleksindeki genleri, *RAD51* paraloglarını (*RAD51B*, *RAD51C* ve *RAD51D*), *BRIP1*, *BARD1*, *PALB2*'nin yanı sıra *RAD50*, *CHEK2*, *ATR* ve *ATM*'yi içerir [24-26]. Bu değişiklikler toplu olarak HRD'yi gösterir ve BRCA disfonksiyonu ile ilişkili genomik kararsızlık nedeniyle sıklıkla bir "BRCAness" fenotipine sahip olarak tanımlanır [27].

Geleneksel olarak over kanserleri, histolojik alt tipe bakılmaksızın tipik olarak platin bazlı kemoterapi gibi sitotoksik ajanlarla tedavi edilmiştir. Aslında, over kanserinde kullanılmak üzere FDA onaylı sadece 3 hedefli ajan vardır. Birincisi, vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) karşı bir monoklonal antikor olan bevacizumab'dır. Bu antianjiyojenik tedavi, nükseden, platine dirençli yumurtalık kanserinde kullanımı için onaylanmıştır [28, 29]. İkincisi, bir poli-riboz polimeraz (PARP) inhibitörü olan olaparibdir. Olaparib, BRCA mutasyonları ve tekrarlayan hastalığı olan hastalarda kullanım için 2014 yılında onaylanmıştır[30]. PARP inhibisyonunun başarısı, HRD ortamında PARP1 fonksiyonunun kaybının (yani, *BRCA1/2* mutasyonu) DNA aberasyonlarında bir artışa neden olduğu fikrine dayanmaktadır, bunların tümü HRD nedeniyle tamir edilemez ve sentetik letalite yoluyla hücre ölümüyle sonuçlanır [31-33]. Sentetik letalite, iki genin veya yolun inaktivasyonu olduğunda meydana gelir; bunların ikisi de kendi başına öldürücü etkiler yaratmaz, ancak kombine edildiğinde hücre ölümüne neden olur. PARP-BRCA sentetik letalitenin altında yatan birkaç mekanizma vardır. Birincisi, PARP-1, bir PARP inhibitörünün varlığında kalıcı olabilen ve DSB'lere yol açan replikasyon çatallarının çökmesine neden olan tek sarmal kırılmaların (SSB'ler) onarımında rol oynar. BRCA kusurlu kanser hücreleri, homolog rekombinasyona sahip olmadığı için, ortaya çıkan

DSB'ler, kanser hücreleri için seçici olarak toksik olacaktır. Başka bir mekanizma PARP yakalamasını içerir. PARP inhibitörleri, PARP-1'i kendiliğinden veya baz eksizyon onarımı sırasında oluşan SSB'lere hapseder. Hapsedilmiş PARP-1, replikasyona, çözülmesi için homolog rekombinasyon gerektiren bir engel oluşturabilir [34]. İlginç bir şekilde, BRCA mutant tümörlerde PARP inhibitörlerinin seçici aktivitesine rağmen, doğrulanmış BRCA mutasyonları olan bireylerden daha fazla hasta PARP inhibitörü tedavisine yanıt vermiştir [35]. Aslında, platine duyarlı, nükseden over kanseri olan hastalar için idame tedavisi olarak PARP inhibitörü niraparibin kullanıldığı yakın zamanda yayınlanan bir faz III klinik çalışma, BRCA veya HRD durumlarına bakılmaksızın, hastaların progresyonsuz sağkalımlarının önemli ölçüde uzadığını göstermiştir [36]. Bu gözlemler, PARP inhibitörlerinin over kanseri tedavisinde daha geniş bir role sahip olabileceğini düşündürmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde bugüne kadar olaparib, rucaparib ve pazopanib FDA onaylıdır [37] [38]. Bir tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olan Pazopanib, tümör hücrelerinin büyüme ve yayılımına neden olan sinyalleri bloke ederek kanser büyümesini yavaşlatmaktadır. Bu ajanın da NCCN guidelinee girdiği ve tedavi yaklaşımında kullanıldığı görülmektedir [39]. Şu anda, farklı PARP inhibitörlerini tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanarak yapılan klinik çalışmalar devam etmektedir [40, 41]. Bunun gibi çalışmalar, PARP inhibitörlerinin over kanseri olan birçok birey için tedavi sürecini değiştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Over kanseri hastalarda, immüterapi ajanı olarak NCCN rehberinde de yer alan Pembrolizumab, MSI-H veya dMMR tümör markeri pozitif olan kişilerde kullanımı önerilmektedir. Bu immün checkpoint inhibitörü, kanserde T hücrelerini etkisiz kılan durumu ortadan kaldırarak, T hücrelerinin kanser hücrelerine saldırabilmesini sağlamaktadır [39].

2.2.2.1. Kalıtsal Meme ve Over Kanseri Sendromu (HBOC)

Kalıtsal Meme ve Over Kanseri Sendromu, *BRCA1* veya *BRCA2* genlerindeki mutasyonlarla ilişkili olarak artmış meme kanseri ve over kanseri riski ile ilişkilidir. Ayrıca, bölgeye özgü over kanseri aileleri olarak adlandırılan, fazla over kanseri olan ancak meme kanseri olmayan az sayıda aileye dair raporlar da vardır. Bu aileler *BRCA1*'deki mutasyonlarla bağlantılıdır ve kalıtsal meme-over sendromunun benzersiz bir fenotipini temsil ettikleri düşünülmektedir. Kalıtsal meme kanserlerinin çoğu

BRCA1 ve *BRCA2*'deki kalıtsal mutasyonlarla açıklanabilir. Aile öyküsüne göre seçilmemiş over kanseri olan hasta serilerini incelerken, hastaların yaklaşık % 10 ila % 15'inde bu genlerin herhangi birinde zararlı bir mutasyon vardır. Ailesinde over kanseri veya erken başlangıçlı meme kanseri öyküsü olan over kanseri hastalarını incelerken, *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyonu bulma olasılığı önemli ölçüde artar. Aslında genellikle kalıtsal over kanserinin büyük bir kısmının *BRCA1* veya *BRCA2* anormallikleri ile açıklandığı belirtilmektedir. Jinekolojik Onkoloji Grubu, over kanseri ve pozitif aile öyküsü olan kadınlarla ilgili prospektif bir çalışma yürütmüştür. Spesifik olarak, şu özelliklerden herhangi birine sahip olan over kanseri hastalarını kaydetmişlerdir: over kanseri olan birinci derece akraba, over kanseri olan ikinci derece akraba ile birlikte erken başlangıçlı meme kanseri olan birinci derece akraba veya erken başlangıçlı (50 yaş altı alınmıştır) meme kanseri olan birinci ve ikinci derece akraba. Mutasyonlar için taranan 26 uygun hastadan sekizinde *BRCA1* ve dördü *BRCA2*'de olmak üzere 12 kişide zararlı mutasyonlar bulunmuştur [42, 43]. Üreme, demografik ve yaşam tarzı faktörleri over kanseri riskini etkilese de, en önemli over kanseri risk faktörü, hastalığın aile öyküsüdür. Yayımlanmış 15 çalışmanın büyük bir meta analizinde, over kanseri ile en az bir birinci derece akraba ile ilişkili over kanseri riski için olasılık oranını 3.1 olarak hesaplandı. Kalıtsal meme ve over kanser sendromu düşünülen bir hasta seçiminde NCCN kriterleri göz önünde bulundurulur. Bu kriterlere göre:

1. Ailede *BRCA1/2* mutasyonu olan birey varlığı
2. Meme kanseri olan hastada aşağıdakilerden en az birinin varlığı
 - a) 45 yaş ve altında tanı almış olmak
 - b) 50 yaş altında tanı almış olmak ve ailede en az bir yakınının 50 yaş altında meme kanseri ve/veya yumurtalık kanser tanısı alması
 - c) Kişide biri 50 yaş ve altında olmak üzere iki meme kanseri tanısı olması
 - d) Herhangi bir yaşta tanı almış olmakla birlikte ailede en az iki birinci derece yakınında 50 yaş altında meme ve/veya yumurtalık kanseri tanısı
 - e) Ailede erkek meme kanseri öyküsü
 - f) Kişide yumurtalık kanseri tanısı da konması
 - g) En az iki yakınında pankreas ve prostat kanseri de bulunması

- h) ≤ 60 yaşında TNBC(Triple Negatif Meme Kanseri) tanısı konmuş hastalar
- ı) Etnik olarak yüksek riskli olma (Aşkenazi Yahudisi gibi)

Kalıtsal meme over kanser sendromunda Claus ve Gail modelleri, araştırma çalışmalarında ve klinik danışmanlıkta risk hesaplama modeli olarak rutin pratikte kullanılmaktadır. Her ikisinin de sınırlamaları vardır ve iki modelden türetilen risk tahminleri hasta için farklı olabilir [44, 45]. Ayrıca ekibimizin de geliştirmiş olduğu bir algoritma şuan halihazırda test edilmekte ve olumlu sonuçlar vermektedir [46]. Bu modellerin kullanımı özel bilgi ve uzmanlık gerektirir.

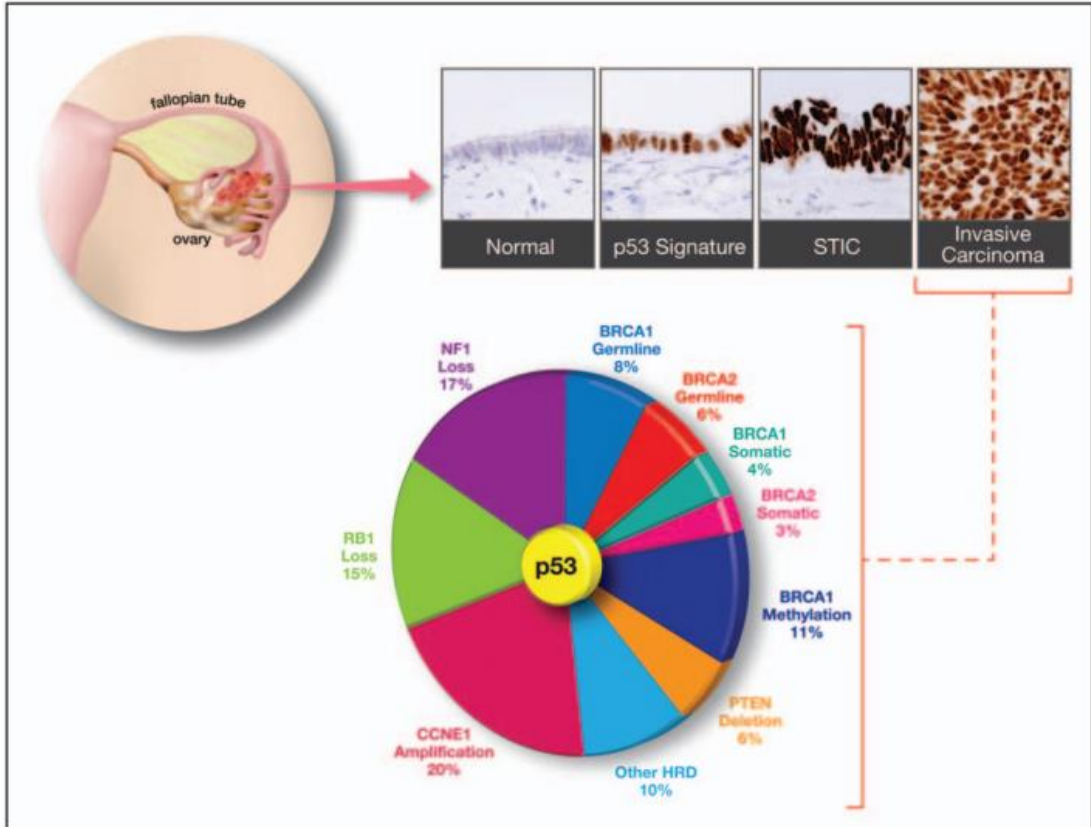
2.2.2.2. Lynch Sendromu veya Kalıtsal Non-Poliposis Kolon Kanseri (HNPCC)

Lynch sendromu, bir kadının over kanseri riskini artırır. Kanser, birkaç farklı gendeki mutasyonlardan kaynaklanır ve ayrıca kolorektal kanserin yanı sıra mide, ince bağırsak, karaciğer, safra kanalı, idrar yolu, endometriyum, beyin ve merkezi sinir sistemi ve muhtemelen meme kanserleri riskini artırır. Lynch sendromlu hastalarda yanlış eşleşme tamir genlerindeki kusurlar (dMMR), kalıtsal over kanserlerinin yaklaşık % 10'unu ve genel vakaların % 1 ila % 2'sini oluşturur. Bununla birlikte, bu sendromlu hastalarda, bireysel olarak over kanseri gelişme riski yaklaşık %12'dir. Artan riskin mekanizması, MMR mekanizmasındaki kusurlar ve bunun sonucunda hücreleri çoklu mutasyon riskine sokan genetik istikrarsızlıktan (MSI) geçer; bununla birlikte, over kanserinde karsinogenez, yanlış eşleşme tamir genlerindeki kusurlar (mismatch repair damage) tanımının ötesinde iyi çalışılmamıştır [47].

2.2.3. Yüksek Dereceli Seröz Over Kanserinde CCNE1

HGSOC, *TP53* geninin zorunlu mutasyonu, homolog rekombinasyon DNA onarım yolağındaki mutasyonlar ve yaygın kopya sayısı değişiklikleri ile karakterizedir [14]. Over kanserinde en yaygın kopya sayısı değişikliklerinden biri, 19q12 lokusunun amplifikasyonudur. Bowtell laboratuvarı, *CCNE1*'i 19q12 amplikonunun anahtar sürücüsü olarak haritalamak için 19q12 amplikonundaki genlerin sistematik bir şekilde devre dışı bırakılmasını kullanmıştır [48]. *CCNE1*, Cyclin E1'i kodlar ve bir dizi solid tümörde ve HGSOC vakalarının yaklaşık % 20'sinde Siklin E1 protein seviyeleri hücre döngüsü sırasında değişir ve sikline bağımlı kinaz 2'yi (CDK2) bağlayarak ve aktive ederek G1-S faz geçişinde önemli bir rol oynar. Aberran Cyclin E1 ekspresyonunun planlanmamış DNA replikasyonunu, sentrozom amplifikasyonunu ve kromozom

instabilitesini tetiklediği bilinmektedir [21, 49, 50]. Önemli olarak, *CCNE1* amplifikasyonu, primer veya refrakter kemo-dirençli over kanseri [51] ve zayıf genel sağkalım[52] ile ilişkilidir. İlginç bir şekilde, *CCNE1* amplifikasyonu ve artmış Cyclin E1 proteini STIC (seröz tubal intraepitelyal karsinom-HGSC öncü lezyon) lezyonlarında saptanabilir, bu da *CCNE1*'deki düzensizliğin HGSC gelişiminde erken bir olay olduğunu gösterir [49, 50] [53].



Şekil 2-1: Yüksek dereceli seröz over karsinomlarının (HGSOC'ler) patolojik ve genomik özellikleri [54]

2.3. Over Kanserinde Epigenetik

Epigenetik, DNA sekansının kendisinin modifikasyonu olmaksızın gen ekspresyonundaki fenotipik değişikliktir ve tümör oluşumundaki rolü giderek artan şekilde ortaya konmaktadır. Son zamanlarda, epigenetik modifikasyonla düzenlenen kanserle ilişkili birçok genin, malign over tümörünün başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynadığı belirlenmiştir [55]. Epigenetik, DNA metilasyonunu, nükleozomun yeniden konumlandırılmasını, histon post-translasyonel modifikasyonunu ve miRNA'lar gibi kodlanmayan RNA'lar tarafından gerçekleştirilen post-transkripsiyonel gen regülasyonunu içerir [56].

Transkriptom, yüksek derecede karmaşıklığa sahiptir ve çok sayıda kodlayıcı ve kodlamayan RNA türünü kapsar. Tarihsel olarak, RNA molekülleri, moleküler biyolojinin central dogmasında kapsüllendiği gibi, genler ve proteinler arasında basit bir ara ürün olarak yer almıştır. Bu nedenle, haberci RNA (mRNA) molekülleri, proteinleri genetik kod aracılığıyla kodladıkları için en sık incelenen RNA türleri olmuştur. Protein kodlayan mRNA'ya ek olarak, fonksiyonel olan çeşitli kodlamayan RNA (ncRNA) molekülleri grubu vardır. Daha önce, bilinen ncRNA'ların çoğu, mRNA translasyonunda yer alan ribozomal RNA'lar ve transfer RNA'lar, eklemede yer alan küçük nükleer RNA (snRNA'lar) ve rRNA'ların modifikasyonunda yer alan küçük nükleolar RNA'lar (snoRNA'lar) gibi temel hücresel işlevleri yerine getirmektedir. Daha yakın zamanlarda, ncRNA'ların repertuarını geliştiren yeni RNA sınıfları keşfedilmiştir. Örneğin bu tür bir ncRNA sınıfı, her ikisi de transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen mikroRNA (miRNA) ve piwi-etkileşimli RNA'yı (piRNA) içeren küçük kodlamayan RNA'lardır. Bir başka kayda değer ncRNA sınıfı, uzun kodlamayan RNA'lardır (lncRNA'lar). Fonksiyonel bir sınıf olarak, lncRNA'lar ilk olarak cDNA kitaplıklarının büyük ölçekli dizilemesi sırasında farelerde tanımlanmıştır. LncRNA'lar için, kromatin yeniden modelleme, transkripsiyonel kontrol ve transkripsiyon sonrası işleme dahil sayısız moleküler fonksiyon keşfedilmiştir, ancak büyük çoğunluğu tam olarak karakterize edilmemiştir [57].

Son zamanlarda yapılan yüksek verimli çalışmalar, genomun ~% 80'inin, protein kodlama potansiyeli olmadan RNA'lara, yani kodlamayan RNA'lara (ncRNA'lar) kopyalandığını ortaya çıkarmıştır ve bu da 'junk DNA' kavramının doğru olmadığını göstermektedir. MikroRNA'lar (miRNA'lar) ve uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), epigenetik, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası seviyelerde en güçlü gen ekspresyon düzenleyicileri olarak ortaya çıkan en iyi çalışılmış aile sınıflarını temsil eder. Kanser araştırmaları, ncRNA'ların, özellikle de miRNA'ların ve lncRNA'ların, kanser hücrelerinin biyolojisinin hemen hemen her yönündeki aktif anlatımının yanı sıra hem meme hem de over tümörlerinde düzensiz ifadelerinin altını çizmiştir [58].

2.3.1. Kodlamayan RNA'lar

2.3.1.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar (lncRNA)

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA'lar), uzunluğu 200 nükleotidden daha uzun olan fonksiyonel hücresel RNA moleküllerini ifade eder. lncRNA'lar son birkaç yılda kanser de dahil olmak üzere patolojik süreçlerde potansiyel olarak önemli düzenleyiciler olarak ortaya çıkmıştır. Artık lncRNA'ların, birçok durumda DNA, protein ve RNA ile etkileşimleri yoluyla kanserde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca, biriken kanıtlar, büyük lncRNA sınıflarının over kanseri için işlevsel olduğunu kabul etmiştir [59].

Yüksek çözünürlüklü mikroyarray ve büyük ölçüde paralel dizileme teknolojisinin [60, 61] gelişmesiyle, insan genomunun % 98'den fazlasının görünür protein kodlama potansiyeline sahip olmayan RNA transkriptlerine kopyalandığı kabul edilmiştir. Bu kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar) boyutlarına göre lncRNA'lar (> 200 nükleotid) ve küçük ncRNA'lar (≤ 200 nükleotid) olarak sınıflandırılabilir. MikroRNA'lar (miRNA'lar), small interfering RNA'lar (siRNA'lar) ve PIWI-etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar) gibi küçük ncRNA'lar, birçok hastalığın başlaması ve ilerlemesi üzerindeki dikkate değer işlevleri nedeniyle yıllardır yoğun bir şekilde araştırılmıştır [62-64]. Bununla birlikte, lncRNA'lar nispeten az anlaşılmış bir ncRNA sınıfıdır. lncRNA'ların en uygun tanımı, protein kodlamayan uzun RNA transkriptleridir.

lncRNA'lar yaşamın her dalında evrimsel koruma, genomik lokusların damgalanması, kromatinin yeniden şekillenmesi, enzimatik aktivitenin allosterik olarak düzenlenmesi ve farklı hücre kaderlerinin modüle edilmesi gibi geniş biyolojik işlevler sergilemektedir. Son çalışmalar, lncRNA'ların over kanserinde belirgin bir işleve sahip olduğunu, lncRNA'ların aşırı ekspresyonu, eksikliği veya mutasyonunun tümöröenez, metastaz, prognoz veya tanı ile ilişkili olduğunu göstermektedir [65-68].

lncRNA'lar birincil olarak komşu transkriptler arasındaki genomik yakınlıklarına göre kategorize edilmektedir ve bunlar sens (protein kodlayan bir gen ile örtüşen), insanlarda en yaygın ikinci grup antisens (zıt iplik üzerinde diğer transkriptin bir veya daha fazla eksonu ile örtüşen), çift yönlü promotör (protein kodlama transkriptine antisens promotörlerin 1 kb'si içinde kopyalanan), intronik (bir protein kodlama geninin intronundan transkripsiyon olan), insanlarda lncRNA moleküllerinin en büyük alt sınıfı olan intergenikler (iki protein kodlayan gen arasındaki genomik aralık içinde bağımsız

bir birim olarak bulunur), enhancer (bir protein kodlayan genin bir güçlendirici bölgesinden kopyalanır) ve iki benzersiz lncRNA olan dairesel RNA'lar (miRNA süngerleri ve ayırıcı miRNA'lar olarak işlev görür) [69, 70] ve sno-lncRNA'lar (eksonükleolitik kırılma ile eksize edilmiş ve dallanmış intronlardan işlenir ve ribonükleoprotein kompleksleri oluşturarak spesifik protein bileşenleri ile kompleks halinde fonksiyonlarını yerine getirir) [71].

LncRNA'ların DNA, kromatin, sinyal, düzenleyici proteinler ve çeşitli hücresel RNA türleri ile etkileşime girerek birkaç önemli fizyolojik süreci etkilediği gösterilmiştir. Kromatine bağlı lncRNA'lar, yerel kromatin mimarisini kontrol ederek veya düzenleyici moleküllerin spesifik lokuslara alınmasını yönlendirerek gen ekspresyonunu düzenleyebilir. LncRNA'ların birçok proteinle etkileşimi, protein komplekslerinin birleşmesini teşvik edebilir veya protein-protein etkileşimlerini bozabilir, lncRNA'larla mRNA etkileşimleri, kesilmeyi (splicing), mRNA stabilitesini veya translasyonu veya miRNA'yı hedef mRNA'dan ayırmayı etkilemek için mRNA metabolizmasının birçok yönüyle ilgili protein gruplarını işe alabilir [72, 73]. Bunun üzerine, lncRNA'lar etki mekanizmalarına göre dört kategoriye ayrılabilir: (1) Sinyaller: Mekansal-zamansal bir şekilde fonksiyonel biyolojik koşullar için moleküler bir işaretçi görevi görür, gelişimsel ipuçlarına, hücresel sinyallere ve diğer uyaranlara yanıt verir, (2) Baskılama: DNA'ya bağlanan diğer RNA'lara veya proteinlere müdahale ederek veya bunlarla rekabet ederek transkripsiyonu baskılama, (3) Kılavuzlar: Proteinlere bağlanır ve kompleksi DNA'ya doğrudan veya dolaylı etkileşim yoluyla kromatine ve diğer spesifik hedeflere taşır, bu da her iki komşunun veya uzaktaki genlerin gen ifadesinde değişikliklere yol açar ve (4) İskeleler: Farklı efektör moleküllerinin bir araya getirildiği merkezi platformlar olarak hizmet eder [74-76].

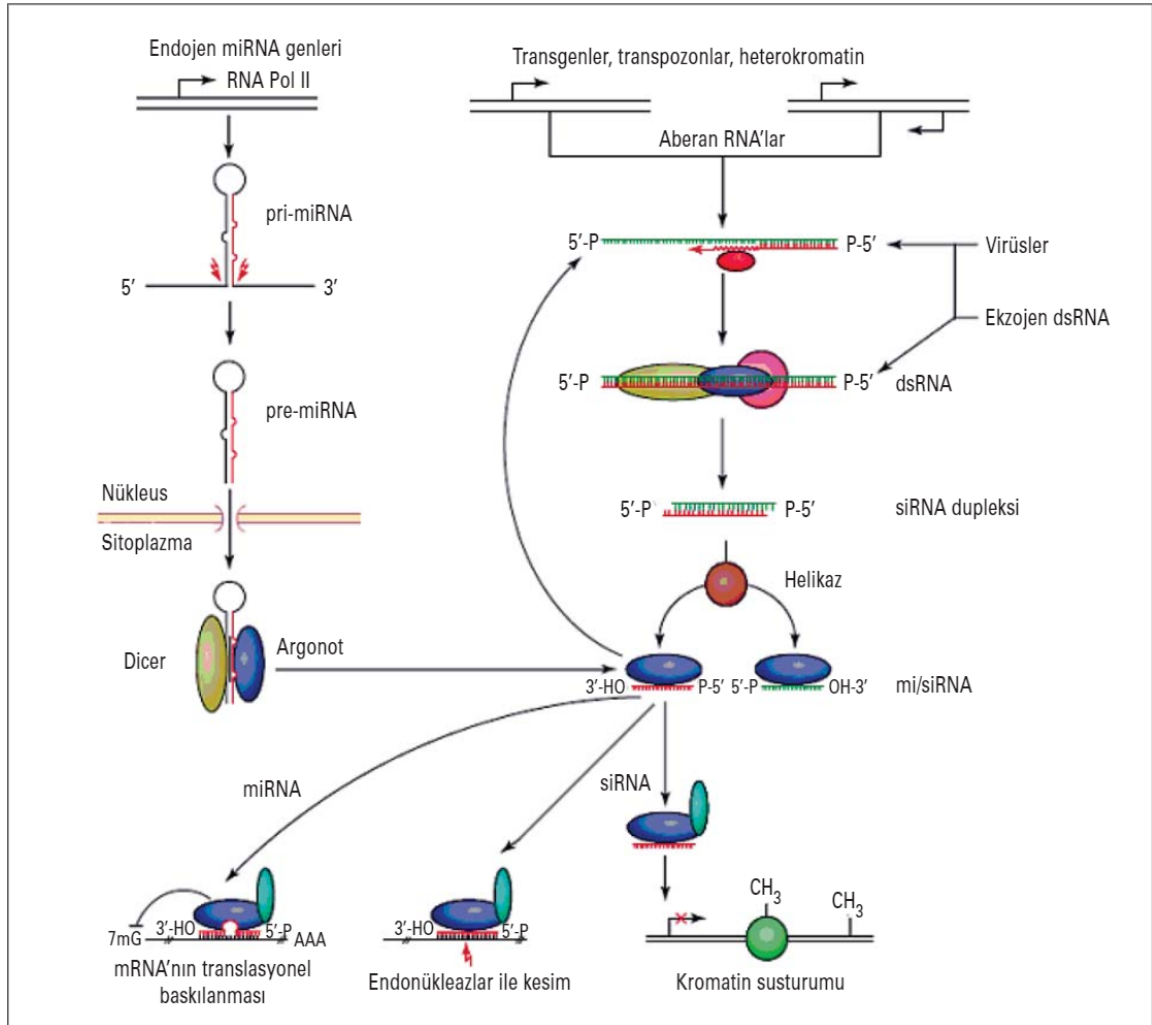
2.3.1.2. Kısa kodlamayan RNA'lar: miRNA ve siRNA

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen düzenleyici ağın ayrılmaz bir parçasıdır. Tek bir miRNA, yüzlerce protein kodlama geninin ekspresyonunu kontrol edebilir ve proliferasyon, farklılaşma, stres tepkileri, DNA onarımı, hücre yapışması, hareketlilik, inflamasyon, hücre hayatta kalması, yaşlanma ve apoptoz gibi geniş bir biyolojik fonksiyon yelpazesini modüle edebilir. Bunların tümü tümörögenез için temeldir. Onkogenik miRNA'ların ("onco-miR'ler") aşırı ekspresyonu, genetik amplifikasyonu ve işlev kazandırıcı mutasyonunun yanı sıra; tümör baskılayıcı miRNA'ların ("baskılayıcı-

miR'ler") gen silinmesi ve işlev kaybı mutasyonu, insan kanseriyle bağlantılıdır. Spesifik bir onko-miR veya baskılayıcı-miR'lerin düzensizliğine ek olarak, kusurlu bir miRNA biyogenez yolağından kaynaklanan global miRNA seviyelerindeki değişiklikler tümör oluşumunda rol oynar. Bireysel onko-miR'lerin ve baskılayıcı-miR'lerin ve bunların kanserdeki hedef genlerinin işlevi, birçok çalışmada açıklanmıştır [77] . Son on yılda, çok sayıda düzenleyici yolun, miRNA'ların biyogenezini (transkripsiyon ve işleme), stabilitesini ve susturma aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir [78] .

MiRNA'ların biyogenezi, RNA polimeraz II (Pol II) tarafından genomda kodlanan miRNA geninin transkripsiyonu ile başlar. Bu işlem, bir saç tokası yapısı içeren uzun birincil (pri-miRNA) transkriptler üretir [79, 80]. Pri-miRNA'lar aşamalı işleme tabi tutulur. İlk işlem çekirdekte gerçekleşir ve "Drosha mikroişlemci" kompleksini oluşturan RNase III enzimi Drosha ve onun kofaktörü DGCR8'i içerir. Drosha kompleksi, saç tokası yapısının tabanını tanır, onu böler ve ~ 60-70-nt firkete şeklindeki öncü miRNA'yı (pre-miRNA) serbest bırakır. Pre-miRNA daha sonra Xpo5 yoluyla sitoplazmaya aktarılır ve ikinci işlemde RNase III enzimi Dicer ve kofaktör transaktivasyonuna duyarlı RNA bağlayıcı protein (TRBP/ TARBP2) tarafından 22-nt miRNA duplex oluşturulur. Bu genel yolun istisnaları olarak, bazı miRNA'lar miRronlar olarak bilinen miRNA içeren intronların eklenmesi dahil olmak üzere Drosha'dan bağımsız veya Dicer'den bağımsız mekanizmalar tarafından üretilir[81]. MiRNA duplesi, tercihen bir ipliği çıkaran ve olgun miRNA'yı tutan ("kılavuz iplik") bir Argonaute (Ago) proteinine yüklenir. Ago proteinleri ve GW182 / TNRC6 protein ailesi, miRNA kaynaklı susturma kompleksini (miRISC) oluşturur. MiRNA / Ago kompleksleri, miRNA molekülünün 5' ucunu (nts 2-8), 3' çevrilmemiş bölgesinde (3'-UTR) kısmen tamamlayıcı bir diziyle eşleştirerek hedef mRNA'ları tanır. Belirli bir miRNA, yüzlerce hedef mRNA'yı aynı anda düzenleyebilir, ancak düzenleme derecesi yalnızca % 30-50'dir. Burada miRNA'lar mRNA molekülünün diziye özgü yıkıma uğraması ya da translasyona girememesine neden olarak bu işi gerçekleştirir. Bu sırada mRNA'nın köken aldığı genin transkripsiyon hızı veya şeklinde bir değişiklik olmamakta, sentezlenmiş olan mRNA'ya bağlanan miRNA/siRNA(small interfering RNA) sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır. Bu post-transkripsiyonel gen susturumu, RNA interferansı (RNAi) olarak bilinmekte ve tüm ökaryotlarda gözlenmektedir[82]. RNAi yolları, bu siRNA ve miRNA adı verilen küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA parçacıkları aracılığıyla gerçekleşir (Şekil 2-

2). Bu iki tür kodlamayan RNA'nın sentez ve olgunlaşma süreçleri ortak aşamalarda geçse de aralarında önemli farklar bulunmaktadır (Tablo 2-1).



Şekil 2-2: RNAi mekanizmasında rol alan miRNA ve siRNA'ların sentez ve etki yolları [83]

Tablo 2-1: Bazı özellikleri açısından miRNA ve siRNA'nın rolleri [84]

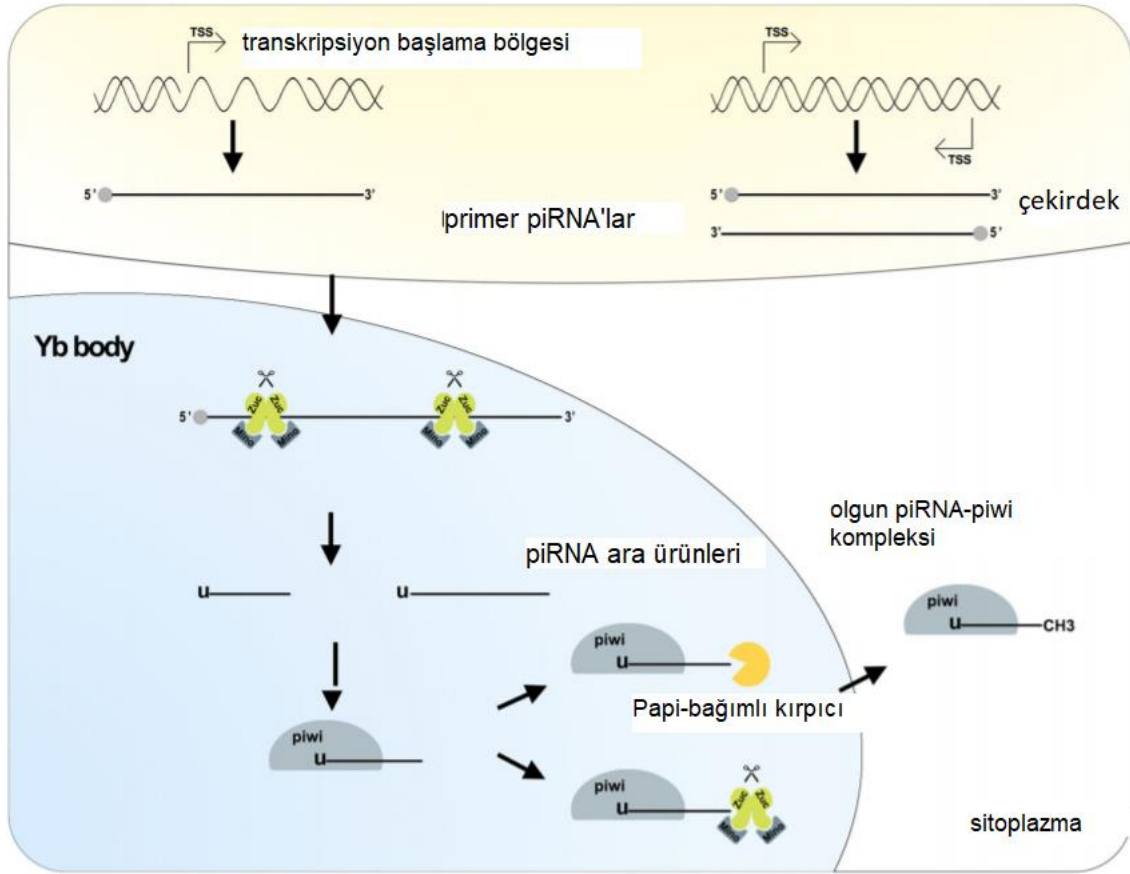
Özellik	miRNA	siRNA
Sentezi	Endojen RNA'lardan	Ekzojen veya endojen RNA'lardan
Sentez enzimi	RNA polimeraz II	RNA bağımlı RNA polimeraz
Esas etki mekanizması	Translasyonun baskılanması	mRNA'nın yıkılması
Normal homeostazda işlevi	Var	Var
Kanser tanı ve prognozda kullanımı	Var	Yok
Araştırma ve tedavi amacıyla kullanımı	Var	Var

2.3.1.3. Kısa kodlamayan RNA'lar: Piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA)

Piwi etkileşimli RNA'lar (piRNA'lar), piwi protein ailesinin üyelerine bağlanan yaklaşık 24–31 nükleotid uzunluğunda yeni küçük kodlamayan RNA molekülleri ile düzenleyici rollerini yerine getirirler. Son zamanlarda ortaya çıkan kanıtlar, memeli germ hattına ek olarak piRNA'ların çeşitli insan dokularında dokuya özgü bir şekilde ifade edildiğini ve transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel seviyede anahtar sinyal yollarını modüle ettiğini göstermektedir. Özellikle, çok sayıda çalışma piRNAs / piwi kompleksini örneğin meme (BC), akciğer (LC) kanserinin oluşumu, gelişimi, metastazı ve nüksü ile ilişkilendirmiştir [85].

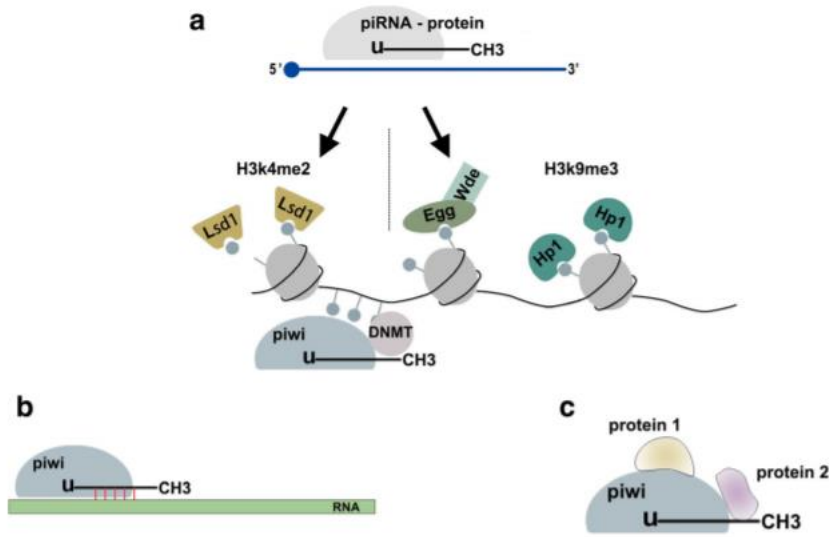
Benzersiz şekilde eşlenmiş piRNA'ların büyük bir kısmı, piRNA kümeleri olarak adlandırılan iki tip genişletilmiş (200kb'ye kadar) genomik lokustan kaynaklanır. Kodlama genlerine benzer şekilde, tek sarmallı kümeler, RNA polimeraz II yoluyla transkriptler üreten Pol II Ser5P ve H3K4me2 zirveleri ile işaretlenmiş promoterleri içerir, bu da 5-terminal capping, 3-terminal poliadenilasyon ve bazen seçici kesilmeye(splicing) uğrar. Tersine, çift sarmallı kümeler her iki genomik sarmaldan kopyalanır, transkripsiyonu başlatmak için yakındaki kodlama genlerinin promoterlerine bağlıdır ve aynı şekilde işlenmez [86] (Şekil 2-3).

piRNA kümeleri, sitoplazmik Yb gövdesine taşınan birincil piRNA'lar üretir. Zuc ve onun ko-faktörü Mino birincil piRNA'ları keserek 5' urasil ile piRNA ara ürünleri üretir [87]. Piwi proteini, bir PAZ ve piwi alanından oluşan evrimsel olarak korunmuş bir yapı içerir. PAZ tercihen piRNA ara ürünlerini 5 urasil ile bağlar. Piwi proteinine bağlandıktan sonra piRNA'lar, Zuc riboendonuclease tarafından 3'-uç bölünmesi yoluyla veya Papi'ye bağımlı düzeltici yoluyla olgunlaşır. Hen1 tarafından metilasyona uğradıktan sonra da olgun piRNA-piwi kompleksi oluşur [88] (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: piRNA biyosentez mekanizması [85]

Son çalışmalar, piRNA'ların, transkripsiyonel veya post-transkripsiyon seviyede fizyolojik ve patolojik süreçlerde hayati bir rol oynadığını göstermektedir. Şekil 2-4'de kanserdeki piRNA'ların işlevi ve mekanizmaları görülmektedir. piRNA / piwi kompleksi aracılı transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturma da yine Şekil 2-4a ve 4b'de gösterilmiştir. Burada 3a'da TGS düzeyinde, piRNA-protein kompleksi, bastırıcı H3K9me3 işaretlerini hedef DNA gövdesine getirmek ve destekleyici bölgelerden aktif H3K4me2 işaretlerini kaldırmak için susturma makine bileşenlerini kullanır. Ek olarak piRNA'lar/piwi kompleksi DNMT'yi işe alır, genik olarak CpG bölgelerinde metilasyona neden olur. 3b'de PTGS seviyesinde, piRNA'lar/piwi kompleksi, hedeflenen RNA'lara bağlanır ve tamamlayıcı sekansla bunların işlevini engeller. 3c'de piRNA'lar/piwi kompleks-protein etkileşimini gösterir. PiRNA'lar / piwi ve proteinler arasındaki etkileşim, proteinlerin hücre altı lokalizasyonunu değiştirir ve birden fazla proteinin etkileşimini kolaylaştırır.



Şekil 2-4: piRNA/piwi protein işlevi [85]

Yapılan çalışmalarda, piRNA'lerden piR-52207'nin ENOCa'da up-regüle edildiği ve SOCa'da piR-52207 ve piR33733'ün de arttığını bulunmuştur. Up-regüle piR52207, ENOCa hücre proliferasyonunu, göçünü ve tümör oluşumunu teşvik eden NUDT4, MTR, EIF2S3 ve MPHOSPH8 hedeflerinin 3'-UTR'si ile 2–21 nt bağlanma bölgesi içerir. SOCa'da piR-33733, LIAS3'-UTR'leri hedeflerken piR-52207, ACTR10 ve PLEKHA5 3'-UTR'leri ve 5'-UTR'leri bağlayarak artan anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinlerin azalmasına yol açar. piR-52207 ve piR33733, bu nedenle, bu malignite sınıfı için olası terapötik hedefler olarak bunları destekleyerek, transkripsiyon sonrası seviyede çok sayıda hücre sinyal yoluna dahil olmak suretiyle over kanseri onkogeneze katılır [89].

2.4. RNA-Sekanslama (RNA-SEQ)

RNA-Seq, hibridizasyon bazlı mikroarray ve Sanger sekans bazlı yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha az arka plan gürültüsü ve daha geniş bir RNA ekspresyon aralığı ile çoklu çözünürlük katmanları ve transkriptom verisi sağlar. Gen ekspresyonunu ölçmenin ötesinde, RNA-Seq tarafından üretilen veriler, alternatif olarak eklenmiş genlerin, füzyon genlerinin, mutasyonların/SNP'lerin, alele özgü ekspresyonun, yeni transkriptlerin ve kodlamayan RNA'ların tanımlanmasını hızlandırır. RNA-Seq, kanser araştırmalarında daha erken teşhis sağlamak, patolojik kökenleri tespit etmek ve hasta grupları arasında anormal genleri ve düzensiz moleküler yolları tanımlamak için başarıyla çalışılmaktadır [90].

2.5. Monozigotik İkizler

Bir sperm tarafından döllenmiş tek bir yumurtanın bölünmesiyle oluşan ikizler monozigotik (MZ) veya tek yumurta ikizi olarak adlandırılırlar. Dizigotik ikizler ise iki farklı yumurtanın 2 farklı sperm tarafından döllenmesiyle oluşurlar. Bu nedenle, monozigot ikizler tek bir zigottan köken aldıkları için genetik olarak özdeş görülürken; dizigot ikizler iki farklı zigottan gelişmekte ve farklı genetik özelliğe sahip olan genetik varyasyonun ortalama yarısını paylaşmaktadırlar. Yakın zamana kadar, monozigot ikiz oluşum sürecinin rastgele gerçekleştiği düşünülse de son yıllardaki çalışmalar, zigotun bölünme olgusuna epigenetik mekanizmaların dahil olduğunu göstermektedir [91].

Monozigotik ikizler doğumdan önce ve sonra neredeyse tüm genetik varyantlarını paylaşırlar. Bununla birlikte, MZ ikizler genellikle tip 1 diyabet (T1D;% 61), tip 2 diyabet (% 41), otizm (% 58 ila% 60), şizofreni (% 58) ve farklı kanser türleri (yaklaşık % 16) açısından uyumsuz fenotip gösterebilmektedirler. Bu gözlemler, birçok karmaşık özellik açısından genotipin tek başına fenotipik varyasyonu tam olarak belirleyemeyebileceği ve epigenetiğin bu noktadaki rolünün ne kadar önemli ve belirleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Bu nedenle, hastalıkla uyumsuz MZ ikiz çiftler, gebelik sırasında ortak genetik ve çevresel faktörleri paylaşmalarına rağmen hastalıklarda epigenetik fonksiyonları incelemek için ideal bir model sağlar. Uyumsuz MZ ikizlerinin analizi, yaşlanma, kanser, otoimmün hastalık ve psikiyatrik, nörolojik ve diğer özelliklerde epigenetik mekanizmaları incelemek için başarıyla kullanıldığı gösterilmiştir [92, 93].

Over kanseri gelişiminde yeni genlerin araştırılması gerek hastalığın etiyolojisi hakkında gerekse erken tanı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde son derece önem arz etmektedir. Bu projede over kanseri açısından diskordant (OK-diskordant) ve doğada birbirine en yakın genotipe sahip olan monozigotik ikiz kardeşlerde genom düzeyinde transkriptomik farklılıklar araştırılmıştır. Literatüre bakıldığında OK-diskordant monozigotik ikizler üzerinde yapılmış çok az sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Yapılan bir çalışmada [94] BRCA mutasyonu taşıyan meme ve over kanser tanısı açısından diskordant olan monozigotik ikizlerde görülen değişken penetransın kopya sayısı değişiklikleri ile ilişkili olup olmadığı araştırılmış ancak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bir başka çalışmada [95] ise BRCA mutasyon taşıyıcılığı durumunda hasta olmayan monozigotik ikizlerdeki meme kanseri riski araştırılmış ve

ikizler arasındaki fenotipik uyumsuzluğun çevresel faktörlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aynı çevrede yetişen yani ortak çevreyi kullanan ancak over kanseri açısından diskordant fenotip gösteren monozigotik ikizlerde over kanserinin etiyolojisini tüm genomu kapsayacak şekilde gen ekspresyonunu araştıran bir çalışmanın literatürde bulunmadığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada da hedeflenen, epitelyal over kanseri ile ilişkili post transkripsiyonel seviyede epigenetik değişiklikleri tanımlamak için over kanseri açısından uyumsuz monozigot ikiz bireylerde ve ikiz olmayan kardeşinde periferik kan ve over dokusu modellerini araştırmaktır. MZ ikizler yaş, cinsiyet, kohort etkileri, birçok anne etkisi ve erken çevre faktörleri açısından eşleştirilir ve neredeyse aynı genomlara sahiptir. Bu nedenle, uyumsuz MZ çalışmaları, hastalıkla ilişkili epigenetik farklılıkları saptamak için özellikle güçlü ve daha az önyargılı bir tasarımıdır. Bu çalışma, MZ ikiz çiftlerinde epitelyal over kanseri ile ilişkili kan ve doku değişikliklerini eş zamanlı araştırmaya yönelik yapılan ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, over kanseri genetiği açısından hem tanıda biyobelirteç potansiyeli olan moleküllerin belirlenebilmesi hem de post transkripsiyonel sürecin aydınlatılmasında literatüre önemli veriler sağlaması açısından oldukça değerlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Planlanan çalışmada kliniğimize 2012 yılında başvurmuş, 10.01.2019 tarih ve 7787 sayılı Etik Kurul kararı ile İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda uygunluk onayını alan ve yapılan *BRCA1/2* gen analizinde *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı olduğu belirlenmiş, over kanserli (HGSOC) hasta ve mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozigotik ikizi ile mutasyon taşıyıcısı sağlıklı kız kardeşine ait periferik kan lenfosit hücreleri ve bunların gerek hastalık gerekse profilaktik olarak alınmış normal ve tümörlü over dokusunu içeren parafin bloğu kullanılmıştır. Monozigotik ikizlerden hasta olan bireyin periferik kan dokusu ve tümör dokusu; hasta olmayan ikizine ait periferik kan dokusu ve sağlıklı over dokusu; mutasyon taşıyıcısı ikiz olmayan kardeşe ait periferik kan dokusu ve sağlıklı over dokusu olmak üzere çalışmada toplam 3 periferik kan dokusu ile 3 over dokusu incelenmiştir (Tablo 3-1). Bu 6 örneğe ait hücre izolasyonlarından sonra ticari kit ile total RNA izolasyonu bu hücrelerden yapılmıştır. Örneklerin hazırlanmasının ardından sırasıyla total RNA'dan rRNA uzaklaştırması, RNA fragmentasyonu, adaptör bağlanması ile cDNA sentezi, hazırlanan cDNA kütüphanesinin PZR aşaması ve BGI Seq 500 platformunda transkriptom dizileme aşamaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen ham verilerin biyoinformatik analizleri yapılmıştır.

3.1. Çalışmada İncelenen Numunelere Ait Bilgiler

Çalışmada araştırılan örneklere ait bilgiler ve örnek kodlarına ilişkin bilgi Tablo 3-1'de yer almaktadır.

Tablo 3-1:İncelenen Örnekler ve Örnek Kodları

Kişiler	Over doku numarası	Hücre (PK-lenfosit) numarası
Over kanseri (OK) monozigotik ikiz	BR1432D	BR987A
Sağlıklı monozigotik ikiz	BR1447D	BR1447A
Sağlıklı kız kardeş	BR2032D	BR3219A

Çalışmada incelenen monozigotik ikizler ve ikiz olmayan kardeş aile ağacındaki şematik gösterimi Şekil 3-1'de gösterilmiştir.

Soğutmalı Eppendorf Santrifüj	(HERAEUS)
Thermal Cycler	(VWR)
Qubit Fluorimetre	(THERMOFISHER SCIENTIFIC)
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer	(AGILENT TECHNOLOGIES)
BGISEQ-500 NGS Cihazı	(BGI)

3.4. Deneysel Yöntemler

3.4.1. Örneklerin Hazırlanması

Periferik kandan öncelikle hücre izolasyonu sonrasında “Quick-RNA™ MiniPrep Kit (Zymo Research)” ile total RNA izolasyonu yapılırken; FFPE dokusundan “FFPE RNA Purification Kit (Norgen)” ile doğrudan total RNA izolasyonu yapıldı. Transkriptom analizi yapmak için izolasyon sonrası elde edilen total RNA miktarının 5µg’dan fazla olmasına dikkat edildi.

3.4.1.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

EDTA’lı tüpe alınmış 6 mL kan 1/1 oranında PBS ile dilüe edildi. Dilüe edilmiş kan örneği 2 mL Ficoll üzerine yavaş yavaş pipet yardımıyla eklendi ve santrifüj edildi. Üst fazında serum, alt fazında eritrosit ve diğer ara fazında beyaz kan hücreleri bulunan tüpten lenfositler pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpte toplandı ve tekrar santrifüj edildi. Pellet üzerine PBS eklendi ve pipetlenerek pellet çözüldü. Çözülmüş pellet krio tüpe dağıtıldı. Krio tüpler santrifüj edildi, süpernatant döküldü. Elde edilen hücreler -80°C’de sonraki aşamalar için saklandı.

3.4.1.2. Lenfositlerden Total RNA İzolasyonu

Lenfositlerden total RNA izolasyonunda Quick-RNA™ MiniPrep kitine ait protokol uygulandı. Bu protokole göre RNA izolasyonu üç adımdan oluşur: Numune lizis/homojenizasyon, numune temizleme ve gDNA çıkarma ve son aşamada RNA saflaştırma. İlk aşamada kit içerisindeki RNA Lizis Tamponu ile hücreler süspansiyon edildi ve kısaca vortekle çalkalandı. 1 dakika boyunca 10.000g’de santrifüjlenerek lizat temizlendi. Süpernatantı bir toplama tüpünün filtresine aktarıldı ve gDNA’nın çoğunu çıkarmak için 1 dakika boyunca 10.000g’de santrifüjlendi. RNA Lizis tamponundaki (1:1) örneğe 1 hacim etanol (% 95) eklenip iyice karıştırıldı. Karışım yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve 30 saniye santrifüjlendi, süpernatant atıldı. Daha sonra kit içerisinde bulunan RNA Prep Buffer’dan 400 µL karışım üzerine eklendi, santrifüj edildi ve biriktirme tüpü içerisinde toplanan atık atıldı. Ardından RNA Wash Buffer’dan 700 µL

eklenerek tekrar santrifüj edildi, biriktirme tüpü içerisinde toplanan atık atıldı. Tekrar RNA Wash Buffer'dan 400 µL eklendi ve iki dakika santrifüj edildi. Son olarak RNaz-içermeyen su da eklenerek, 30 saniye/1 dakika boyunca santrifüj sonrası RNA elde edildi.

3.4.1.3. Parafin Bloktaki Dokudan (FFPE) Total RNA İzolasyonu

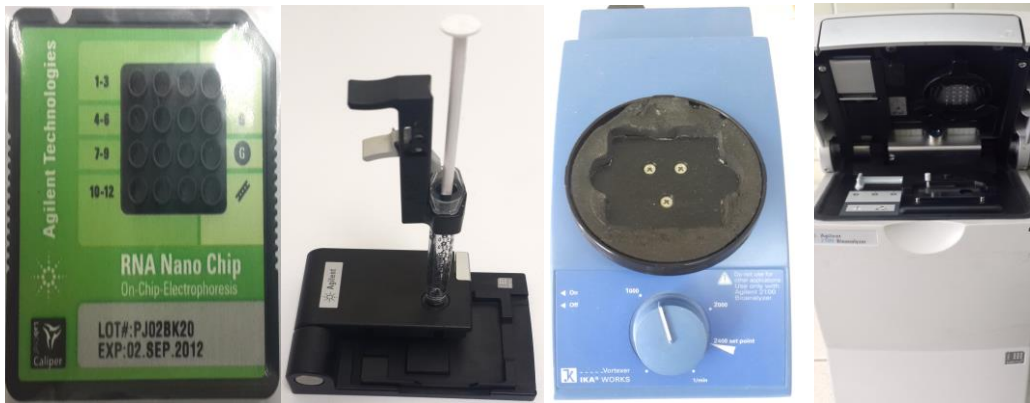
FFPE RNA Saflaştırma Kiti, formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) doku örneklerinden toplam RNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması için hızlı bir yöntem sağlar. Burada temel olarak gerçekleştirilen aşamalar: Deparafinizasyon, lizatin hazırlanması, RNA'nın kolona bağlanması, kolonun yıkanması ve RNA'nın elde edilmesi şeklindedir. İlk aşamada, bir mikrotom kullanarak FFPE doku bloklarından 20µm kalınlıkta kesitler alındı. Kesit, RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, üzerine 1 mL ksilen eklenip vortekslendi. 50°C'de 5 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 2 dk 14.000g'de(~ 14.000RPM) santrifüjlendi ve pellete dikkat edilerek ksilen uzaklaştırıldı. 1 mL % 96 etanol eklendi ve vortekslendi. 2 dk 14.000 g'de santrifüj edildikten sonra pellete dikkat edilerek etanol uzaklaştırıldı. Bu etanol aşaması tekrar yapıldı ve pellet oda sıcaklığında 10 dk havayla kurutuldu. İkinci aşamada, örneğe 300 µL kitteki A tamponu ve 10 µL sulandırılmış Proteinaz K eklenip vorteksleyerek karıştırıldı. 55°C'de 15 dk, ardından 80°C'de 15 dk inkübe edildi. 300 µL RL Tamponu eklenip vorteksleyerek karıştırıldı. 600 µL %96 etanol eklenerek vorteksle karıştırıldı. Üçüncü aşamada, temiz bir kolon tüpe yerleştirildi ve önceki aşamadaki tüm lizat kolondan geçirilecek şekilde 3.500g'de (~ 6.000RPM) santrifüj edildi. Her defasında süpernatant atıldı. Dördüncü aşamada, örneğin bulunduğu kolona 400 µL Yıkama Solüsyonu A eklendi ve 1 dk santrifüjlendi, süpernatant atıldı. Bu aşama 3 kez tekrarlandı. En son kolonun kuru olduğundan emin olmak için boş şekilde 2dk santrifüjlendi, toplama tüpü atıldı. Beşinci aşama olan RNA elüsyonu aşamasında, kolon kit ile sağlanan yeni 1,7 mL Elüsyon tüpüne yerleştirildi, üzerine 20-50 µL Elüsyon Solüsyonu A eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 200g'de (~ 2.000 RPM) 2 dk santrifüjlenip 14.000g'de 1 dk bir dönüş yapıldı. Kolondan ayrıştırılan hacmi not edildi ve hacmin tamamı taşınmamışsa, sütun 1 dakika daha 14.000g ile döndürüldü. Son aşamada elde edilmiş olan saf total RNA sonraki çalışma adımına kadar -20°C'de saklandı.

3.4.1.4. Örneklerin Kalite Ölçümleri

Total RNA numune kalite kontrolü yapmak için Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) cihazında “Agilent RNA 6000 Nano Kit” (Agilent Technologies) protokolü kullanılarak RNA konsantrasyonu, RIN (RNA Integrity Number/RNA Bütünlük Değeri) değeri, 28S/18S ve fragman uzunluğu dağılımı ölçüldü.

Biyoanalizör ölçümü öncesi jel ve boya karışımı hazırlandı. Bu aşamanın ardından Chip'in hazırlanması, örnek ve ladder'ın Chip'e yüklenmesi, ölçüm işlemi, ölçümün değerlendirilmesi ve analizi işlemleri gerçekleştirildi. Agilent RNA 6000 Nano Kit protokolü sırasıyla takip edildi: Kit içeriği sırasıyla Agilent RNA 6000 Ladder, RNA 6000 Nano boya, Agilent RNA 6000 jel ve Agilent RNA 6000 marker, 2 adet elektrot temizleyici proponal karışımı, filtreli tüpler, 30 eppendorf tüp ve RNA Nano Chip'ler'den oluşmaktadır. Protokolde öncelikle reaktiflerin en az yarım saat oda ısısında bekletilmesinden sonra çalışmaya başlanması önerilmektedir. 30 dakika oda ısısında kalan Agilent RNA 6000 jeli yaklaşık olarak 550 µL alınarak filtreli tüpe aktarıldı. 1500 g'de 10 dakika 24°C oda sıcaklığında santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan jel 65 µL hacimlerde DNaz ve RNaz içermeyen eppendorf tüplere aktarıldı. Her bir alikot örnek tek bir kullanım için +4°C'de muhafaza edildi. Vorteks ve 10 saniye kısa süreli santrifüj yapılan mavi kapaklı RNA 6000 Nano boyadan 1 µL alındı ve jel alikotunun üzerine eklendi. Karışım yaklaşık 1 dakika vorteksledikten sonra, 13000 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapıldı. Jel ve boya karışımları taze olarak kullanıldığından, günlük hazırlandı, artan solüsyon atıldı. Chip hazırlanma işlemine geçildi. RNA Nano chip çıkartıldı ve jel boya karışımından 9 µL koyu siyah ile işaretli G kuyusuna koyuldu. Daha önce klipsleri ve enjektörünün çalıştığı test edilmiş, klipsi 3.seviyede olan Chip Priming Station'a (chip yükleme aparatı) jel boya karışımı ilave edilmiş RNA Nano chip yerleştirildi. Enjektör 1 mL seviyesinden başlanarak 0,1 mL seviyesine kadar yavaş bir şekilde bastırıldı ve klipsin enjektörü tutması sağlandı. 30 saniye süre ile bu konumda beklenildi ve klips serbest bırakılarak tekrar enjektörün 1 mL seviyesine gelmesi sağlandı. Bu sayede koyu G kuyucuğundaki jel boya karışımına priming işlemi yapılmış oldu. RNA Nano Chip üzerinde bulunan diğer iki G kuyularına 9'ar µl jel boya karışımı ilave edildi. Jel boya karışımını içeren G kuyuları hariç diğer ladder ve örnek kuyularına, 5'er µL Agilent RNA 6000 markerdan yüklendi. Ladder kuyucuğuna 1 µL Agilent RNA 6000 Ladder, diğer örnek kuyucuklarında elde ettiğimiz RNA örneklerinden 1'er µL örnek yüklendi. Yükleme işlemleri biten RNA

Nano Chip Vortex Mixer IKA-Model MS3 üzerine yerleştirilerek 1200 RPM’de 2 dakika süre ile vorteks yapıldı. Vorteks süresi zarfında Agilent Bioanalyzer 2100 cihaz elektrotlarının yıkama işlemi gerçekleştirildi. “Electrode Clenar Chip”ine öncelikle 350 μ L propanal konularak Chip biyoanalizör elektrotlarına yerleştirildi ve 1 dakika süre ile beklendi. Sonrasında elektrotlarda herhangi bir alkol kalıntısı olmaması için ise Electrode Clenar Chipine 350 μ L distile su eklendi ve 1 dakika süre ile tekrar beklendi ve elektrotların yıkama işlemi gerçekleştirilmiş oldu. Vorteks işlemi biten RNA Nano Chip biyoanalizöre yerleştirildi ve uygun analiz programı seçilerek, biyoanalizör koşumu başlatıldı. Koşum sırasında öncelikli olarak ladderdan boyutları bilinen RNA parçalarına ait nükleotid uzunluk verileri alındı. Ladder’ın ve koşumun sağlıklı olarak çalıştığının anlaşılmasından sonra sırasıyla ladderda bulunan 5, 200, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 nükleotid uzunluklarından elektroferogramda pik alındı. Daha sonra yüklediğimiz her bir RNA örneğine ait elektroferogram görüntülerinde nükleotid boyları ve örnek kaliteleri belirlendi. Belirlenen örnek konsantrasyonları ve sonuçlar analiz edildi. RNA konsantrasyonları 100ng/ μ L ile rRNA oranı 1’in üzerinde olup RNA Integrity Number (RIN) değerleri 7-9 arasında bulunan örnekler array uygulaması için uygun örnekler olarak değerlendirildi.



a) RNA Nano Chip

b) Chip yükleme aparatı

c) Vortex Mixer IKA

d) Agilent Biyoanalizör

Şekil 3-2: “Agilent 2100 Biyoanalizör” uygulamasında kullanılan araçlar

3.4.2. Total RNA'dan mRNA Eldesi

3.4.2.1. Total RNA'dan rRNA Uzaklaştırması

Çalışılacak tüm örneklerden total RNA eldesi sağlandıktan sonra her birine aşağıdaki aşamalar uygulanmıştır. Total RNA'dan rRNA uzaklaştırma aşamasında “MGIEasy rRNA Degredasyon Kit” ile çalışıldı. Bu çalışmada RIN (RNA Bütünlük Numarası) ≥ 7 olan RNA örneği için önerilen RNA girişi miktarı 10 ng - 1 μ g'dir. Düşük kaliteli RNA örneği (RIN < 7) için, RNA girişi 200 ng'den az olmamasına dikkat edilmiştir.

İlk aşamada RNA/Prob Hibridizasyonu gerçekleştirildi: RNA örneğine (yaklaşık 200 ng total RNA) 0,2 mL PCR tüpüne aktarıldı ve 18 μ L toplam hacimde NF (nükleaz içermeyen) su eklendi. Buz üzerinde RNA/Probe hibridizasyon reaksiyon karışımı (18 μ L total RNA, 5 μ L hibridizasyon tamponu, 2 μ L prob karışımı) hazırlandı. Karışım pipetaj ile karıştırıldıktan sonra aşağıdaki reaksiyon koşullarına göre ayarlanmış termal döngü cihazına yerleştirildi, program başlatıldı (Tablo 3-4) .

Tablo 3-4: RNA/Prob Hibridizasyonu Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma	Açık
95°C'de	2 dakika
95-22°C'de	0.1°C/s
22°C'de	5 dakika

Reaksiyonun ardından tüpler hemen çıkarılıp buz üzerinde alındı ve 2 dk beklendi. Kısaca masaüstü santrifüjde döndürüldükten sonra RNaz H digestion aşamasına geçildi. Buz üzerinde RNaz H reaksiyon karışımı hazırlandı. Burada hibridizasyon tüpündeki örneğin üzerine 2 μ L RNaz H ve 3 μ L RNaz H tamponu eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra aşağıdaki reaksiyon koşullarında termal döngü cihazına yüklendi ve başlatıldı (Tablo 3-5).

Tablo 3-5:RNaz H Digestion Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma (45 °C)	Açık
37°C'de	30 dakika
4°C'de	∞

Örnekleri tüpün altına toplamak için kısa süre santrifüj edildi ve hemen bir sonraki adıma geçildi. Bu aşamada DNaz I Digestion karışımı hazırlandı. Bunun için önceki aşamadaki 30 µL karışım içeren tüpe 5 µL DNaz I ve 15 µL DNaz I tamponu eklendi. Pipetaj ile karıştırıldıktan sonra aşağıdaki reaksiyon koşullarında termal döngü cihazına yüklendi ve başlatıldı (Tablo 3-6).

Tablo 3-6: DNaz I Digestion Reaksiyon Koşulları

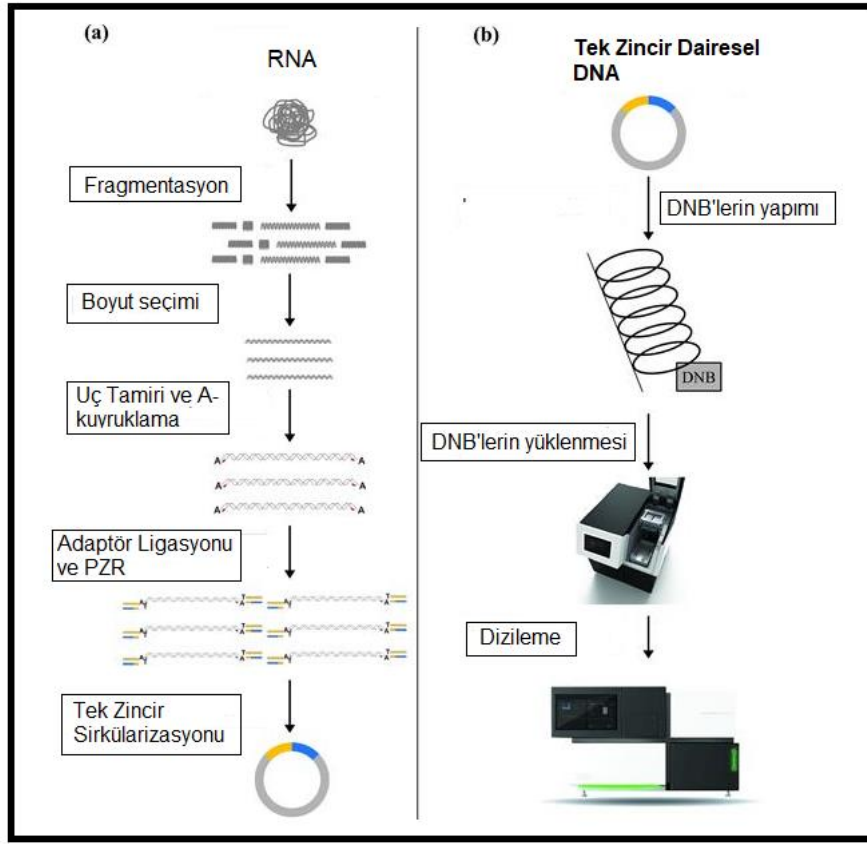
Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma(45 °C)	Açık
37°C'de	30 dakika
4°C'de	∞

Kısa bir santrifüjün ardından tüm ürünler yeni bir 1,5 mL'lik RNaz içermeyen tüpe aktarıldı. Bu aşamada artık RNA temizlenmesi işlemi için RNA Temizleme boncukları 4 °C'deki dolaptan çıkarıldı ve önceden 30 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Kullanmadan önce iyice karıştırmak için vortekslendi. 75 µL yeniden süspanse edilmiş RNA temizleme boncukları yeni tüpe aktarılmış olan RNA örneğine aktarıldı. Karıştırılmasının ardından 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kısaca santrifüjlendikten sonra tüp, sıvı temizlenene kadar 2-5 dakika manyetik rafa yerleştirildi, RNA içeren boncuklara dikkat edilerek süpernatantı dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüp manyetik rafta tutularak tüpe yeni hazırlanmış % 80 etanolden 200 µL eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Bu yıkama adımı 2 kez tekrarlandıktan sonra tüp kapak açık olarak manyetik raf üzerinde tutuldu ve boncukların havayla kuruması sağlandıktan sonra (çok fazla kurumamasına dikkat edildi). Tüp manyetik raftan çıkarıldı ve RNA'yı ayrıştırmak için 12 µL NF su eklenip en az 10 kez pipetlendi. Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi. Kısaca santrifüj edildikten sonra tüpü manyetik rafa yerleştirilip, süpernatantı yeni bir RNaz içermeyen PCR tüpüne aktarıldı.

3.4.2.2. Örneklerin Kalite Ölçümleri

Elde edilen mRNA'ların kalitesi ve miktarını belirleme işlemi yine Agilent Biyoanalizör 2100 cihazında Agilent Biyoanalayser 6000 Nano Kiti kullanılarak yapıldı. mRNA konsantrasyonunun 65 ng/µL olmasına; elde edilen tüm mRNA'ların saflık derecelerinin optik dansitelerinin OD260/280 ≥ 1.8 , OD260/230 ≥ 1.8 olmasına ve RNA 28S:18S oranının ≥ 1.0 , RIN değerinin ise ≥ 7.0 olmasına dikkat edildi.

3.4.3. Kütüphane Hazırlanması



Şekil 3-3: Transkriptom Sekanslama Şematik Gösterimi

3.4.3.1. RNA Fragmente Edilmesi

Önceki aşamada elde edilmiş olan temizlenmiş RNA örneği, NGS kitaplık yapımı için buz üzerine yerleştirildi. Burada ilk aşama olan RNA fragmentasyonu için 10 μ L RNA elüsyon örneği tüpe alındı ve üzerine 4 μ L Fragmentasyon Tamponu eklenip 10 kez pipetlenerek karıştırıldı. Kısa bir santrifüjden sonra termal döngü cihazına yerleştirildi ve insert büyüklüğüne uygun protokole fragmentasyon gerçekleştirildi (Tablo 3-7). Reaksiyon tamamlandığında, tüp hemen 2 dakika buz üzerine koyuldu, sonrasında 10 saniye santrifüjlenip hemen Ters Transkripsiyon aşamasına geçildi.

Tablo 3-7: RNA Fragmentasyonu İçin Önerilen Koşullar

İnsert Büyüklüğü(bç)	RNA Fragmentasyon Sıcaklığı(°C)	RNA Fragmentasyon Süresi(dk.)
150 bç	95°C	8 dk.
250 bç	87°C	6 dk.

3.4.3.2. cDNA Sentezi

Ters transkripsiyon (RT) ve ikinci iplik sentezi aşamasında ilk olarak ters transkripsiyon karışımı hazırlanır: 5 μ L RT tamponu 1 μ L Enzim karışımı ile karıştırılır. 6 μ L RT Karışımı fragmentasyon ürününe aktarıldı, karıştırmak için 10 kez pipetlendi. Çözeltiyi tüpün altında toplamak için kısa süre santrifüjlendi. Termal döngü cihazına yerleştirildikten sonra aşağıdaki Tablo 3-8’de yer alan koşullara göre başlatıldı.

Tablo 3-8: Ters Transkripsiyon Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma	Açık
25°C	10 dk
42°C	30 dk
70°C	15 dk
4°C	∞

Reaksiyon tamamlandığında tüp buza alındı, 10 saniye santrifüjlendi ve ikinci iplik sentezi için karışım hazırlandı. Burada İkinci Zincir Tamponundan 26 μ L, İkinci Zincir Enzim Karışımından 4 μ L alınarak 30 μ L lik karışım elde edildi. Bu karışım RT ürünü üzerine eklendi, pipetaj ile karışması sağlanıp kısa bir santrifüj yapıldı. Tüp, termal döngü cihazına yerleştirildi ve İkinci zincir sentez programında (Tablo 3-9) reaksiyon başlatıldı.

Tablo 3-9: İkinci Zincir Sentez Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma (45°C)	Açık
16°C'de	60 dakika
4°C'de	∞

Bu aşamadan sonra örneğin temizlenmesi için daha önce yapılan manyetik bozcuklarla RNA Temizleme işlemi tekrarlandı. Burada son aşamada RNA'nın manyetik boncuklardan ayrılması için 42 μ L TE Tamponu eklendi. Sonrasında supernatantın 40 μ L'si 0.2ml'lik PZR tüpüne aktarıldı.

Adaptör bağlanmasından önceki son aşama olan “Uç Onarım (End repairing) ve A-kuyruklama (A-tailing)” basamağına geçildi. Burada buz üzerinde 7.1 μ L ERAT

tamponu, 2.9 µL ERAT Enzim karışımı ile karıştırılıp saflaştırılmış ikinci zincir sentez örneğine eklendi, karıştırıldı ve kısa bir santrifüj yapıldı. Tablo 3-10'daki reaksiyon koşullarında termal döngü cihazında reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonunda tüp kısa bir santrifüj ile döndürülerek örneklerin altta toplanması sağlandı.

Tablo 3-10: Uç Onarım ve A-kuyruklama (PolyA Tailing) Reaksiyonu Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma	Açık
37°C	30 dk.
65°C	15 dk.
4°C	∞

3.4.3.3. Adaptörlerin Bağlanması

MGIEasy DNA Adaptöründen (MGIEasy DNA Clean Beads Kit (MGI) 1 µL alınıp 9 µL TE tamponu ile karıştırılarak seyreltildi, karıştırılıp kısa santrifüj edildi. Önceki aşamadaki PZR tüpüne 5 µL seyreltilmiş DNA Adaptörleri eklendi 3 kez (her biri 3 sn) vortekslendi ve kısa süre santrifüjlendi. Adaptör ligasyon karışımı için 23.4 µL ligasyon tamponu ve 1.6 µL DNA Ligaz ile karıştırıldı. Karışım adaptörlerin olduğu PZR tüpüne aktarıldı ve Tablo 3-11'deki reaksiyon koşullarında termal döngü cihazı başlatıldı.

Tablo 3-11: Adaptör Ligasyonu için Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma	Açık
23°C	30 dk.
4°C	∞

Cihazdan alınan tüpler kısa bir santrifüj edildikten sonra toplam 100 µL hacim için 20 µL TE Buffer eklendi ve tüm hacim yeni bir 1,5 mL'lik tüpe aktarıldı. Adaptör Ligasyon ürünlerinin yıkama işlemi için daha önce anlatılan manyetik boncuklarla yıkama işlemi yapıldı. Burada son aşamadaki manyetik boncuklardan DNA elüsyonunda 23 µL TE Tamponu eklendi, sonraki aşamalar önceki gibi gerçekleştirildi ve 21 µL süpernatant yeni bir 0.2 ml'lik PZR tüpüne aktarıldı.

3.4.3.4. cDNA Kütüphanesinin PZR Aşaması

PZR amplifikasyonu için saflaştırılmış 21 µL adaptör ligasyon ürünü, 25 µL PZR enzim karışımı ile 4 µL PZR primer karışımının olduğu 29 µL'lik PZR miksi ile karıştırıldıktan sonra Tablo 3-12'deki koşullarda PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Cihazdan alınan tüpler kısa bir santrifüj edildikten sonra örnekler 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı. 50 µL PZR ürünü yıkama aşaması için manyetik boncuklarla yıkama protokolüne alındı. Burada son aşamadaki manyetik boncuklardan DNA elüsyonunda 32 µL TE Tamponu eklendi, sonraki aşamalar önceki gibi gerçekleştirildi ve 30 µL süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.

Tablo 3-12 : PZR Amplifikasyonu İçin Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Heated Lid/kapak ısıtma	Açık	
95°C	3 dk	1 döngü
95°C	30 sn	
56°C	30 sn	14 döngü
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	1 döngü
4°C	∞	

Saflaştırılmış PZR ürününün kalite kontrolünün yapılması için Qubit® dsDNA HS Test Kitinden yararlanıldı. Saflaştırılmış PZR ürünleri Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında değerlendirildi.

Denatürasyon aşaması için, PZR ürün boyutuna göre 1 pmol PZR ürünü yeni bir 0,2 mL PZR tüpüne aktarıldı. Toplam hacim 48 µL olacak şekilde TE Buffer eklendi. Denatürasyon için termal döngü cihazının kapak ısıtması açılıp örnekler 95°C'de 3 dk kalacak şekilde reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonrası örnekler hızlıca 2 dk buza alındı, kısaca santrifüj edildi.

Tek Zincir Sirkülarizasyon (Single Strand Circularization) reaksiyonu için karışım hazırlandı. Bu karışım için 11,6 µL Splint tamponu, 0,5 µL DNA Rapid Ligaz ile birleştirildi. 12,1 µL'lik miks denatürasyondan çıkan PZR tüpüne eklendi ve Tablo 3-13'deki reaksiyon koşullarında termal döngü cihazında reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon sonrası tüpler buza alındı ve Enzimatik Dijesyon aşamasına geçildi.

Tablo 3-13: Tek Zincir Sirkularizasyon için Reaksiyon Koşulları

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma	Açık
37°C	30 dk
4°C	∞

Bu aşamada Enzimatik Dijesyon karışımı önceki reaksiyon sırasında hazırlandı. Reaksiyon için, 1,4 µL Dijesyon tamponu ve 2,6 µL Dijesyon Enzimi ile karıştırıldı ve 4 µL'lik karışım, Tek zincir Sirkularizasyonun gerçekleştiği PZR tüpüne eklendi. Reaksiyon için tüp, termal döngü cihazında 37°C'de 30 dk bekletildi. Sonrasında 7,5 µL Dijesyon Stop Tamponu reaksiyonu durdurmak için tüpe eklendi, vorteks ve kısa santrifüj yapıldıktan sonra yeni bir 1,5ml'lik tüpe aktarıldı.

Enzimatik Dijesyon ürününün yıkama aşaması için DNA Temizleme Boncuklarından 170 µL alınarak yıkama protokolüne başlandı. Bu aşamada öncekinden farklı olarak 500 µL %80 etanol kullanıldı ve son aşamadaki manyetik boncuklardan DNA elüsyonunda 22 µL TE Tamponu eklendi, sonraki aşamalar önceki gibi gerçekleştirildi ve 20 µL süpernatant yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.

3.4.4. Transkriptom Dizileme

Dizileme işleminde floresan sinyallerini arttırmak için yuvarlanan daire çoğaltması (rolling circle replication-RCR) ile ssDNA çemberiyle DNA nanoball'lar (DNB) üretildi. Takip eden veri analizi çalışması için Paternli nanoarraylere yüklenmiş DNB'ler ve BGISEQ-500 platformunda 100 bp'lik çift uç okumalar kullanıldı. Bu aşamada, BGISEQ-500 platformu, DNA nanoball temelli nanoarrayleri ve Kombinasyonel Prob-Çapa Sentez Dizileme Yöntemi kullanarak aşamalı dizileme birleştirildi.

3.4.4.1. DNB (DNA Nanoball) Yapımı

Önceki aşamada elde edilen kütüphane ürünleri, DNB reaksiyonu için çözündürüldü, karıştırıldı ve buza alındı. 0,2 mL'lik tüplere aşağıdaki Tablo 3-14 izlenerek reaksiyon karışımını hazırlandı.

Tablo 3-14: Make DNB Reaksiyon Karışımı I

İçerik	Hacim (µL)
ssDNA kütüphanesi	V
Low TE Tampon	20-V
Make DNB tampon	20
Toplam hacim	40

V değişken numune hacmini temsil eder. Vorteks ile nazikçe karıştırıldı ve mini santrifüjde 5 sn döndürüldü. Karışımı bir termal döngü cihazına yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı. PZR koşulları Tablo 3-15 açıklanmaktadır:

Tablo 3-15: DNB Reaksiyon Koşulları I

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma(105°C)	Açık
95°C	1 dk
65°C	1 dk
40°C	1 dk
4°C	∞

Make DNB Enzyme Mix II dolaptan çıkartılıp buz üzerine alındı, kısa süre santrifüj edildi. Sıcaklık 4 °C'ye ulaştığında PZR tüpü makineden çıkarıldı. Kısa süre 5 saniye santrifüjlenip buza alındı ve Make DNB reaksiyon karışımı II hazırlandı (Tablo 3-16).

Tablo 3-16: Make DNB Reaksiyon Karışımı II

İçerik	Hacim (µL)
Make DNB Enzim Mix I	40
Make DNB Enzim Mix II	4

Tüm DNB Make reaksiyon karışımı II, DNB Make reaksiyon I'e eklendi. Vorteksle hafifçe karıştırılıp, mini santrifüj yapıldıktan sonra termal döngü cihazına aşağına koşullarda (Tablo 3-17) yerleştirildi. Reaksiyon 4 °C'ye soğuduktan sonra, 20 µL Stop DNB Reaksiyon Tamponu eklendi. Pipetleme yapılarak karıştırıldı.

Tablo 3-17: DNB Reaksiyon Koşulları II

Sıcaklık	Zaman
Heated Lid/kapak ısıtma(35°C)	Açık
30°C	25 dk
4°C	∞

DNB yapımı tamamlandıktan sonra, DNB'yi ölçmek için Qubit® ssDNA Test Kiti ve Qubit® Florometre kullanıldı. Dizileme için, DNB konsantrasyonunun 8 ng / μ L'nin üzerinde olması gerektiğinden az olması durumunda yeni DNB hazırlığı yapıldı.

3.4.4.2. DNB'lerin Yüklenmesi

0,5 mL mikrofij tüplerine 64 μ L DNB Yükleme Tamponu II, 2 μ L Make DNB Enzim Karışımı, DNB 200 μ L eklendi. DNB yükleme karışımı oluşturmak için bileşenler birleştirildi ve 5-8 kez hafifçe geniş çaplı pipetle karıştırıldı. Enzim Karışımı, dNTP karışımı, DNB Yükleme karışımı Kartuştaki ilgili yerlere eklendikten sonra Cihaz protokolüne uygun olarak başlatıldı.

Bu dizileme setinde DNBseq™ teknolojisini kullanıldı. Bir dizileme çalışması, bir DNA çapasının hibridizasyonu ile başlar, ardından, kombinatoryal prob çapa sekanslama (cPAS) kimyası kullanılarak DNA Nanoball'a (DNB) bir floresan prob eklenir. Son olarak, yüksek çözünürlüklü görüntüleme sistemi floresan sinyali yakalar. Optik sinyalin dijital olarak işlenmesinden sonra dizileyici, yüksek kaliteli ve yüksek doğrulukta dizileme bilgisi üretir. DNB yapımı ve sekanslama aşamalarına genel olarak bakıldığında:

- DNB yapımında DNB hazırlama kiti kullanıldı.
- DNB'lerin yüklenmesinde örnek tüpleri BGISEQ-500 dizileme cihazına yerleştirildi.
- Yeni bir Flow Cell hazırlandı.
- Yeni bir reaktif kiti hazırlandı: Reaktif kartuşu çözündürüldü ve ardından gerekli reaktifleri yüklenip karıştırıldı.
- Flow Cell yüklendi: Flow Cell dizileyici tablasına yerleştirildi. Reaktif kiti dizileyiciye yüklendi. Dizileme bilgilerini girmek ve çalışmayı

başlatmak için talimatları izlendi. Kontrol yazılımı arayüzünden dizileme çalışması takip edildi.

Temel olarak dizileme işleminin aşamaları (tek bir fragment üzerinden konuşulduğunda) aşağıdaki sıradadır:

1. Primer bağlanması; Fragmentlere hedef bölgelerin seçimi sırasında eklenen dizilere komplementer primerlerin bağlanması
2. Sekanslama solüsyonunun flow cell'e yüklenmesi
3. Primerden sonraki birinci bazın bağlanması
4. Ortamdaki bağlanmayan bazların uzaklaştırılması
5. Flow cell'in fotoğrafının çekilmesi; her baz farklı renk floresan ışığa gerçekleştirmektedir. Bu nedenle her bağlanan bazın arkasından flow cell'in fotoğrafı çekilerek bağlanan baz saptanmaktadır.

Dizilemede Okuma Uzunluğu: Dizileme çalışmasında, dizileme döngülerinin sayısı okuma uzunluğunun sıralanmasına bağlıdır. Örneğin, bir PE100 (Pair-End 100) döngü çalışması, toplam 200 döngü için 100 döngü (2×100) okuma gerçekleştirir. İntert dizileme çalışmasının sonunda, gerekirse fazladan 10 döngü indeks okuma gerçekleştirilebilir.

3.5. Biyoinformatik Analizler

3.5.1. Kalite Kontrol

Sekanslama işleminin ardından elde edilen veriler, kalite kontrol sürecine alınır. Okuma verilerindeki kontaminasyonlar, adaptör dizileri, belli bazın altındaki diziler (30 baz), düşük kaliteli okumalar filtrelenir. Filtreleme sonrası elde edilen okumaların kalite kontrolü SeqKit [96] yazılımı ile yapılmıştır. Sonrasında yapılan tüm analizler bu yüksek kaliteli veriye dayanmaktadır.

3.5.2. Hizalama İşlemi

Filtreleme işleminin ardından elde edilen temiz okumalar, *homo sapiens* genomunun en güncel versiyonuna (Ensemble 101) Hisat2 [97] yazılımı ile hizalandı. Hizalama işlemi ardından elde edilen dosyalar samtools [98] v1.11 ile sıralandı ve IGV [99] üzerinde görüntülemek için uygun formata getirildi.

3.5.3. Transkript Tanımlama Akışı

Elde edilen hizalanmış veriler, Stringtie [100] v2.1.4 sürümüyle öncelikle sayım verisi alındı. Bu veriler üzerinden de diferansiyel ekspresyon analizine geçilmiştir.

3.5.4. Ekspresyon seviyesi tayini

Diferansiyel ekspresyon analizi Ballgown [101] 2.22.0 versiyonuyla yapılmıştır. Doku ve kan gruplarına ait 3 farklı gruplama tercih edilmiş ve analizler belirlenen gruplamalara göre yürütülerek çıktılar elde edilmiştir.

3.5.5. Annotasyon ve Filtreleme

Ekspresyon değerlerini içeren tablolar, Fold Change değeri eşik değer olarak ± 2 kabul edilerek filtrelenmiştir. P değeri < 0.05 ise ekspresyon değeri önemli olan genlerin seçilmesinde filtre olarak kullanılmıştır. Ayrıca LncRNADisease 2.0 [102] veritabanı verilerine göre annotate edilmiş ve olası hastalıklarla ilişkileri bilgi olarak tablolara eklenmiştir.

3.5.6. Gen Ontoloji (GO) ve Yolak Analizi (KEGG)

Filtreleme sonrası elde edilen genler, Gene Ontology (GO) ve Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) yolak analizleri ShinyGO [103] v0.61 ile yapılmıştır.

3.5.7. LncRNA Analizi

En baştaki tüm fastq dosyaları, öncelikle “.fasta” formatına çevrilmiş, ardından blast ile RNACentral [104] adresinden elde edilen insan miRNA ve piRNA bölgelerine hizalanmıştır. Hizalama sonucunda en fazla eşleşme gösteren miRNA ve piRNA’lar ayrı tablolarda listelenmiştir. Bu tablolar yine LncRNADisease 2.0 [102] veritabanı ile annotate edilmiştir.

3.5.8. Füzyon Gen Analizi

Hizalama sonrası transkriptler, insan veya diğer omurgalılarından alınan çift uçlu RNA dizileme verilerinde somatik füzyon genlerini bulmaya yönelik bir yazılım aracı olan FusionCatcher [105] ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Yapılan çalışmada incelenen aile bireylerinin, kurumumuzda yapılan *BRCA1/2* gen analizinde *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı olduğu ve mutasyonlarının *BRCA1* geninin 20. Ekzonunda bulunan heterozigot formasyonda *c.5266dupC (p.Gln1756Profs*74); rs397507247* mutasyonu olduğu belirlenmiştir. İncelenen bireylere ait klinik bilgiler Tablo 4-1’de yer almaktadır.

Çalışmada ekspresyon düzeyleri incelenen bireyler arasında farklılıkların belirlenmesi amacıyla hasta ve sağlıklı kardeşler farklı gruplar halinde birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma grupları toplam 3 farklı grup olmak üzere aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur;

1.Grup-Over kanseri monozigotik ikizin tümör dokusu ile diğer kardeşlerin sağlıklı over dokularının karşılaştırıldığı grup,

2.Grup- Over kanseri monozigotik ikizin periferik kan örneği ile diğer sağlıklı kardeşlerin kan örneklerinin karşılaştırıldığı grup,

3.Grup- Over kanseri monozigotik ikizin tümör dokusu ile kanının karşılaştırıldığı grup

Tablo 4-1: Vakalara ait Klinik Bilgiler

Vakalara ait Klinik Bilgiler			
Klinik Bilgi	Hasta İkiz (BR987, BR1432D)	Sağlıklı İkiz (BR1447, BR1447D)	Diğer Sağlıklı Kardeş (BR3219, BR2032D)
Örnek alınan yaş	40	43	42
Örnek adı	PK + Over Tümör dokusu	PK + Sağlıklı Over Dokusu	PK + Sağlıklı Over Dokusu
Tanı	Over ca (Seröz Adenokarsinom, az diferansiye,tm çapı 1cm) +karsinom met(tm çapı 2 cm)	Sağlıklı	Sağlıklı
Tanı yaşı	40	-	-
BRCA durumu	BRCA1 + <i>BRCA1; Ex20; c.5266dupC</i> <i>(p.Gln1756Profs*74);</i> <i>rs397507247</i>	BRCA1 + <i>BRCA1; Ex20; c.5266dupC</i> <i>(p.Gln1756Profs*74);</i> <i>rs397507247</i>	BRCA1 + <i>BRCA1; Ex20; c.5266dupC</i> <i>(p.Gln1756Profs*74);</i> <i>rs397507247</i>
Etnik köken	Balkan	Balkan	Balkan
Alkol kullanımı	-	-	-
Sigara kullanımı	10 yıl	10 yıl	10 yıl
Memede kitle	-	Fibroadenom	Fibrograndüler patern
Yumurtalıkta kitle	39y kist	-	Lutein kistleri ve paratubal kist

Menarş yaşı	14	14	13
Menopoz	Post menopoz	premenapoz	premenapoz
Ameliyat	Histerektomi (TAH)+ Ooferektomi (BSO)	Profilaktik mastektomi+ Histerektomi (TAH)+ Ooferektomi (BSO)	Profilaktik mastektomi+ salphingo ooferektomi (BSO)
Hormon kullanımı	-	5 ay	-
Tamoksifen/ Nolvadex	-	-	-
Radyasyon maruziyeti	-	-	-
Hamilelik	3 kez: 2 canlı, 1 ölü(4-6 ay)	2 kez: canlı doğum	2 kez: canlı doğum
Aile hikayesi	Birinci derece maternal akrabada meme ca(tanı yaşı:41);ikinci derecede akciğer ve serviks ca	Birinci derece maternal akrabada meme ca(tanı yaşı:41), over ca (tanı yaşı:40);ikinci derecede akciğer ve serviks ca	Birinci derece maternal akrabada meme ca(tanı yaşı:41), over ca (tanı yaşı:40);ikinci derecede akciğer ve serviks ca

4.1. Verilerin Ön İşlem Sonrası Kalite Sonuçları

Çalışmada incelenen örneklerin total RNA izolasyonu sonrasında Agilent 2100 Bioanalyzer cihazında “Agilent RNA 6000 Nano Kit” protokolü uygulanarak yapılan RNA konsantrasyonu, RIN değeri, 28S/18S ölçümleri Tablo 4-2’de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Total RNA kalite ölçüm sonuçları

Örnek Adı	Test kiti	Konsantrasyon(ng/μL)	RIN/RQN	28S/18S
BR1432D	Agilent RNA6000 nano Reagents Part 1	146	2,4	NA
BR1447D	Agilent RNA6000 nano Reagents Part 1	35	1,50	NA
BR2032D	Agilent RNA6000 nano Reagents Part 1	22	1,7	NA
BR987	Agilent RNA6000 nano Reagents Part 1	35,6	8	1,9
BR1447	Agilent RNA6000 nano Reagents Part 1	45	9,10	1,80
BR3219	Agilent RNA6000 nano Reagents Part 1	290	8,3	1,1

Araştırılan 6 farklı RNA örneğinin (3 doku, 3 periferik kan örneği) RNA-Seq çalışması sonucunda, her bir örnek için ortalama 10.7 Gb veri elde edildi. Ortalama genomu hizalanma oranı %98 olarak tespit edildi.

Sekanslama işleminin ardından elde edilen veriler, kalite kontrol sürecine alındı. Okuma verilerindeki kontaminasyonlar, adaptör dizileri, belli bazın altındaki diziler (30 baz) ve düşük kaliteli okumalar filtrelendi. Elde edilen temiz okuma verilerinin detayı Tablo 4-3’de bulunmaktadır.

Tablo 4-3: Filtreleme Sonuç tablosu

Örnek	Temiz Okuma (Mf)	Temiz (MB)	Baz	Fragment Uzunluğu (bp)	Q20(%)	Q30(%)	GC(%)
BR1447A	48,988266	4898,8266		100	97,450	90,12	40,11
BR3219A	51,435302	5143,5302		100	97,540	90,41	40,21
BR987-1A	51,457928	5145,7928		100	97,555	90,47	40,41
BR1432-D-1A	56,387374	5638,7374		100	97,685	91,36	42,25
BR1447-D-1A	51,343550	5134,3550		100	97,815	91,32	41,44
BR2032-D-1A	41,011982	4101,1980		100	97,085	90,28	41,68

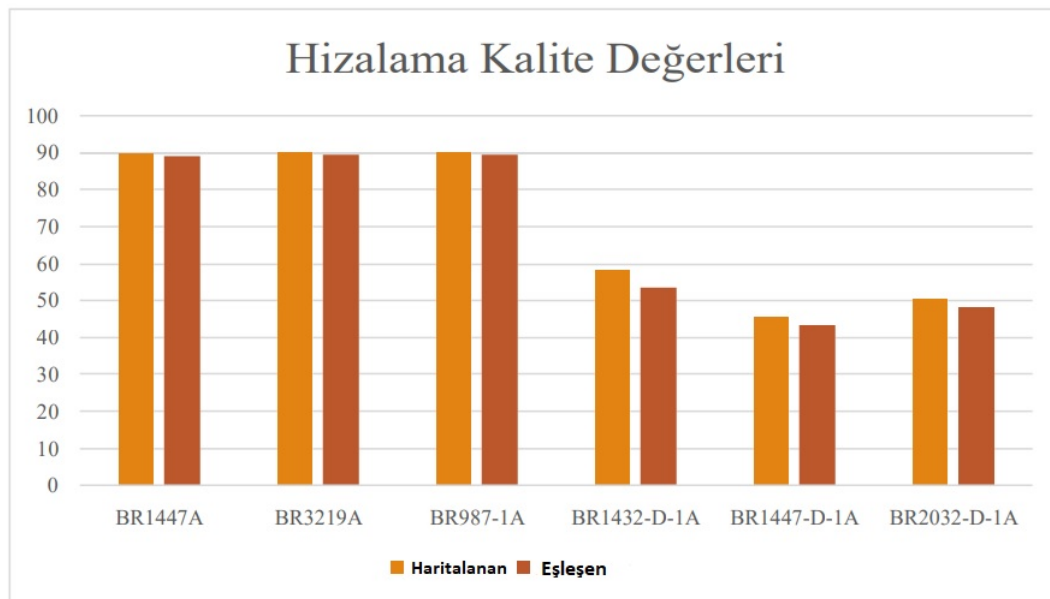
Temiz Okuma (Mf): Filtreleme sonrası fragment miktarı, Birim: Milyon fragment
 Temiz Baz (Gb): Filtreleme sonrası baz miktarı, Birim: Milyon Baz

4.2. Genom Hizalama

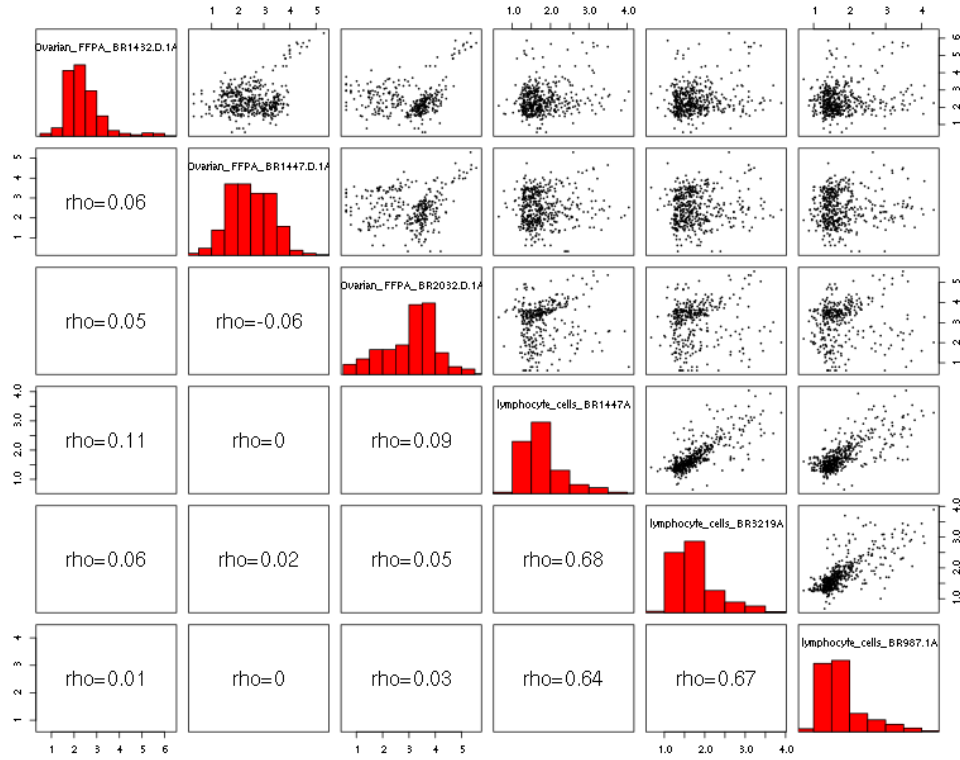
Filtreleme ve hizalama işlemlerinin ardından elde edilen hizalama sonuçları Tablo 4-4 ve Şekil 4-1’de yer almaktadır.

Tablo 4-4: Genom hizalama sonuçları

	BR1447A	BR3219A	BR987-1A	BR1432-D-1A	BR1447-D-1A	BR2032-D-1A
Haritalanan	89,95	90,34	90,06	58,13	45,9	50,64
Eşleşen	89,16	89,56	89,31	53,54	43,49	48,11

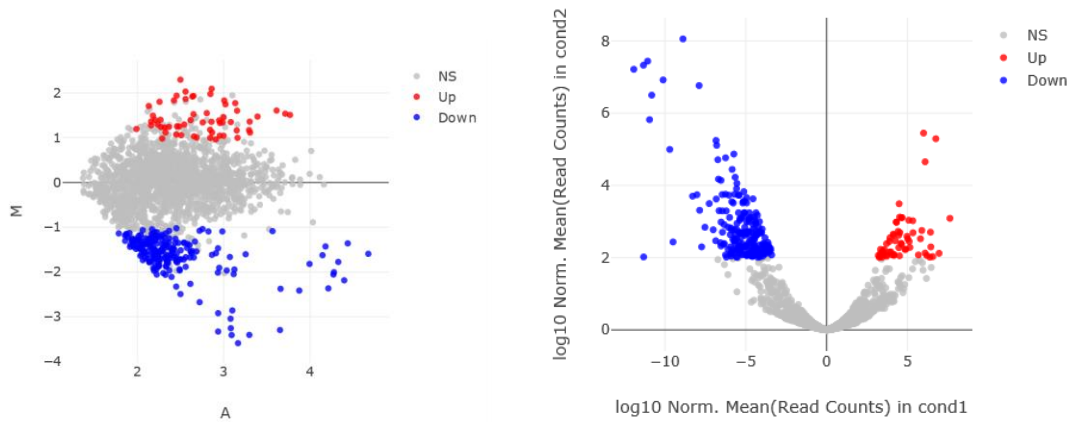
**Şekil 4-1: Hizalama sonucu kalite değerleri**

İncelenen örneklere ait veri kalitesi kıyaslamaları Şekil 4-2’de gösterilmiştir. Burada “rho” değeri dağılımdaki korelasyon ile kaliteyi ifade eder. Rho değerinin 1 e yakın olması beklenir.



Şekil 4-2: Örnekler arası korelasyon

Diferansiyel ekspresyon dağılımı ile en fazla değişim gösteren transkriptlerin gösterildiği maplot ve volcano grafikleri Şekil 4-3’te gösterilmiştir.



Şekil 4-3: Diferansiyel Ekspresyon Dağılımı Maplot (sol) ve Volcano (sağ) Grafikleri

4.3. Ekspresyon Analizi Sonuçları

Yapılan analizde tüm filtreleme aşamalarının ardından diferansiyel ekspresyon analizleri yapılmış ve 3 grupta karşılaştırmalar $\log_2fc > 2$ 'ye göre gerçekleştirilmiştir. Birinci grupta over tümör dokusu, diğer sağlıklı 2 over dokusu ile karşılaştırılmış ve $\log_2fc > 2$ filtrelemesine göre 4530 genin ekspresyonunun anlamlı seviyede değiştiği belirlenmiştir. Bu veri setinde, bilinen tümör markerları olan *CA125/MUC16* ve *CA15-3/MUC1* baz alınarak filtreleme $\log_2fc > 4$ olarak yeniden değerlendirilmiş ve ekspresyonu yüksek 101 kodlayan gen ve 23 lncRNA; ekspresyonu düşük olarak da 245 kodlayan gen ve 42 lncRNA tespit edilmiştir.

İkinci grupta hastaya ait periferik kan örneği, diğer sağlıklı 2 kan örneği ile karşılaştırılmış ve 110 genin ekspresyonunun anlamlı seviyede değiştiği belirlenmiştir. Hastanın kanında 39 kodlayan genin, 9 lncRNA'nın ekspresyonunun arttığı; 29 kodlayan genin ve 9 lncRNA'nın ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir.

Üçüncü grupta hastanın tümör dokusu kendi periferik kanı ile karşılaştırılmış ve 9174 genin ekspresyonunun anlamlı ölçüde değiştiği belirlenmiştir. Bu data setinde de yine *CA125/MUC16* ve *CA15-3/MUC1* baz alınarak filtreleme $\log_2fc > 7$ olarak yeniden yapılmış ve 82 kodlayan genin ve 27 lncRNA'nın ekspresyonunun arttığı; 93 kodlayan genin ve 23 lncRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bu 3 grupta ekspresyonu ortak olarak değişen 9 miRNA bulunmuştur.

Hastanın over tümör dokusunun, sağlıklı ikizine ait over dokusu ve diğer sağlıklı kardeşin over dokusu ile karşılaştırılması sonucunda, tümörde ekspresyonu artan 101 protein kodlayan genin ekspresyon durumu ve bunların değişim kat sayıları ($|\log_2Fc| > 4$) Tablo 4-5'te verilmiştir. Karşılaştırılan doku örneklerinde ekspresyon düzeyindeki artışın 4 ile 9 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu artan protein kodlayan genler (Grup 1)

No	Ensembl ID	Gen Adı	$\log_2fc$ Değeri	Ekspresyon durumu
1	ENSG00000200959	SNORA74A	8,760407677	Tümörde ekspresyonu artmış
2	ENSG00000210156	MT-TK	7,974986311	Tümörde ekspresyonu artmış
3	ENSG00000210100	MT-TI	7,750782119	Tümörde ekspresyonu artmış
4	ENSG00000181143	MUC16/CA125	7,590927463	Tümörde ekspresyonu artmış
5	ENSG00000210107	MT-TQ	7,415084231	Tümörde ekspresyonu artmış
6	ENSG00000225091	SNORA71A	7,323441939	Tümörde ekspresyonu artmış

7	ENSG00000101443	WFDC2/HE4	6,801443183	Tümörde ekspresyonu artmış
8	ENSG00000206634	SNORA22	6,369854461	Tümörde ekspresyonu artmış
9	ENSG00000157765	SLC34A2	6,358590645	Tümörde ekspresyonu artmış
10	ENSG00000210154	MT-TD	6,226146506	Tümörde ekspresyonu artmış
11	ENSG00000210077	MT-TV	6,062448132	Tümörde ekspresyonu artmış
12	ENSG00000147676	MAL2	5,961401796	Tümörde ekspresyonu artmış
13	ENSG00000201998	SNORA23	5,892733205	Tümörde ekspresyonu artmış
14	ENSG00000200394	SNORA38B	5,884445292	Tümörde ekspresyonu artmış
15	ENSG00000185499	MUC1/CA153	5,856746432	Tümörde ekspresyonu artmış
16	ENSG00000124107	SLPI	5,834071224	Tümörde ekspresyonu artmış
17	ENSG00000200354	SNORA71D	5,664049242	Tümörde ekspresyonu artmış
18	ENSG00000143632	ACTA1	5,612594628	Tümörde ekspresyonu artmış
19	ENSG00000212440	SNORA75	5,514195971	Tümörde ekspresyonu artmış
20	ENSG00000168077	SCARA3	5,438079405	Tümörde ekspresyonu artmış
21	ENSG00000199785	SNORA52	5,429344175	Tümörde ekspresyonu artmış
22	ENSG00000252699	SNORA21B	5,358650876	Tümörde ekspresyonu artmış
23	ENSG00000252947	SCARNA1	5,353405012	Tümörde ekspresyonu artmış
24	ENSG00000209082	MT-TL1	5,303380059	Tümörde ekspresyonu artmış
25	ENSG00000210112	MT-TM	5,285521312	Tümörde ekspresyonu artmış
26	ENSG00000238917	SNORD10	5,20127851	Tümörde ekspresyonu artmış
27	ENSG00000113946	CLDN16	5,173129033	Tümörde ekspresyonu artmış
28	ENSG00000125356	NDUFA1	5,171928235	Tümörde ekspresyonu artmış
29	ENSG00000187720	THSD4	5,11891356	Tümörde ekspresyonu artmış
30	ENSG00000201643	SNORA14A	5,075248522	Tümörde ekspresyonu artmış
31	ENSG00000126267	COX6B1	5,06392775	Tümörde ekspresyonu artmış
32	ENSG00000102699	PARP4	5,044935029	Tümörde ekspresyonu artmış
33	ENSG00000221102	SNORA11B	5,040180943	Tümörde ekspresyonu artmış
34	ENSG00000169035	KLK7	5,025135176	Tümörde ekspresyonu artmış
35	ENSG00000184292	TACSTD2	4,990466439	Tümörde ekspresyonu artmış
36	ENSG00000236253	SLC25A3P1	4,977681222	Tümörde ekspresyonu artmış
37	ENSG00000132698	RAB25	4,958343444	Tümörde ekspresyonu artmış
38	ENSG00000251733	SCARNA8	4,902878265	Tümörde ekspresyonu artmış
39	ENSG00000207475	SNORA80E	4,818144992	Tümörde ekspresyonu artmış
40	ENSG00000104879	CKM	4,790406992	Tümörde ekspresyonu artmış
41	ENSG00000102554	KLF5	4,7868153	Tümörde ekspresyonu artmış
42	ENSG00000110092	CCND1	4,785234026	Tümörde ekspresyonu artmış
43	ENSG00000100418	DESI1	4,775198808	Tümörde ekspresyonu artmış
44	ENSG00000143320	CRABP2	4,762976044	Tümörde ekspresyonu artmış
45	ENSG00000117862	TXNDC12	4,739687881	Tümörde ekspresyonu artmış
46	ENSG00000129451	KLK10	4,71354034	Tümörde ekspresyonu artmış
47	ENSG00000210164	MT-TG	4,666840488	Tümörde ekspresyonu artmış
48	ENSG00000111245	MYL2	4,64318264	Tümörde ekspresyonu artmış
49	ENSG00000101856	PGRMC1	4,634404047	Tümörde ekspresyonu artmış
50	ENSG00000272398	CD24	4,617067646	Tümörde ekspresyonu artmış
51	ENSG00000128567	PODXL	4,603941218	Tümörde ekspresyonu artmış

52	ENSG00000164287	CDC20B	4,570995674	Tümörde ekspresyonu artmış
53	ENSG00000215367	TMED11P	4,564750136	Tümörde ekspresyonu artmış
54	ENSG00000263961	RHEX	4,564192414	Tümörde ekspresyonu artmış
55	ENSG00000169715	MT1E	4,561680809	Tümörde ekspresyonu artmış
56	ENSG00000111775	COX6A1	4,552411538	Tümörde ekspresyonu artmış
57	ENSG00000198258	UBL5	4,47591977	Tümörde ekspresyonu artmış
58	ENSG00000164736	SOX17	4,466773013	Tümörde ekspresyonu artmış
59	ENSG00000198467	TPM2	4,453246638	Tümörde ekspresyonu artmış
60	ENSG00000107796	ACTA2	4,446752544	Tümörde ekspresyonu artmış
61	ENSG00000252481	SCARNA13	4,434983237	Tümörde ekspresyonu artmış
62	ENSG00000135373	EHF	4,375812767	Tümörde ekspresyonu artmış
63	ENSG00000176340	COX8A	4,369872433	Tümörde ekspresyonu artmış
64	ENSG00000169218	RSPO1	4,36295059	Tümörde ekspresyonu artmış
65	ENSG00000205835	GMNC	4,362652244	Tümörde ekspresyonu artmış
66	ENSG00000239264	TXNDC5	4,338839335	Tümörde ekspresyonu artmış
67	ENSG00000112167	SAYSD1	4,328350363	Tümörde ekspresyonu artmış
68	ENSG00000212443	SNORA53	4,320382123	Tümörde ekspresyonu artmış
69	ENSG00000111319	SCNN1A	4,30659583	Tümörde ekspresyonu artmış
70	ENSG00000169245	CXCL10	4,287744806	Tümörde ekspresyonu artmış
71	ENSG00000210174	MT-TR	4,276787675	Tümörde ekspresyonu artmış
72	ENSG00000150551	LYPD1	4,276445597	Tümörde ekspresyonu artmış
73	ENSG00000110195	FOLR1	4,251889025	Tümörde ekspresyonu artmış
74	ENSG00000243667	WDR92	4,25030941	Tümörde ekspresyonu artmış
75	ENSG00000252712	SCARNA14	4,248694143	Tümörde ekspresyonu artmış
76	ENSG00000130045	NXNL2	4,237754076	Tümörde ekspresyonu artmış
77	ENSG00000112667	DNPH1	4,211817759	Tümörde ekspresyonu artmış
78	ENSG00000159713	TPPP3	4,190552916	Tümörde ekspresyonu artmış
79	ENSG00000125618	PAX8	4,18817053	Tümörde ekspresyonu artmış
80	ENSG00000149131	SERPING1	4,185756493	Tümörde ekspresyonu artmış
81	ENSG00000200792	SNORA80A	4,163612173	Tümörde ekspresyonu artmış
82	ENSG00000120885	CLU	4,160346706	Tümörde ekspresyonu artmış
83	ENSG00000113361	CDH6	4,156895356	Tümörde ekspresyonu artmış
84	ENSG00000188659	SAXO2	4,148432083	Tümörde ekspresyonu artmış
85	ENSG00000142655	PEX14	4,120285992	Tümörde ekspresyonu artmış
86	ENSG00000148346	LCN2	4,10771674	Tümörde ekspresyonu artmış
87	ENSG00000186265	BTLA	4,106419888	Tümörde ekspresyonu artmış
88	ENSG00000047457	CP	4,10289664	Tümörde ekspresyonu artmış
89	ENSG00000168530	MYL1	4,101665556	Tümörde ekspresyonu artmış
90	ENSG00000116039	ATP6V1B1	4,091247123	Tümörde ekspresyonu artmış
91	ENSG00000101773	RBBP8	4,06796743	Tümörde ekspresyonu artmış
92	ENSG00000198125	MB	4,061970648	Tümörde ekspresyonu artmış
93	ENSG00000196083	IL1RAP	4,05091532	Tümörde ekspresyonu artmış
94	ENSG00000117394	SLC2A1	4,048283121	Tümörde ekspresyonu artmış
95	ENSG00000207523	SNORA66	4,044928268	Tümörde ekspresyonu artmış
96	ENSG00000120093	HOXB3	4,040515976	Tümörde ekspresyonu artmış

97	ENSG00000116649	SRM	4,0373385	Tümörde ekspresyonu artmış
98	ENSG00000206199	ANKUB1	4,023523016	Tümörde ekspresyonu artmış
99	ENSG00000205707	ETFRF1	4,014360317	Tümörde ekspresyonu artmış
100	ENSG00000125877	ITPA	4,007021963	Tümörde ekspresyonu artmış
101	ENSG00000147889	CDKN2A	4,000237684	Tümörde ekspresyonu artmış

Hastanın over tümör dokusunun, sağlıklı ikizine ait over dokusu ve diğer sağlıklı kardeşin over dokusu ile karşılaştırılması sonucunda, tümörde ekspresyonu artan 23 uzun kodlanmayan RNA (lncRNA) transkripleri, değişim katsayıları ($|\log_2 Fc| > 4$) ve bu lncRNA'ların "lncRNA veri tabanına" [102] göre tespit edilen hastalıklarla ilişki durumu Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Karşılaştırılan doku örneklerinde ekspresyon düzeyindeki artışın 4 ile 9 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu artan LncRNA'lar (Grup 1) (*Novel transkript)

No	Ensembl ID	Gen Adı	log2fc değeri	Ekspresyon Durumu	Gen Tipi	Hastalık İlişkisi
1	ENSG00000269900	RMRP	8,812	Artmış	Bilinen	Akciğer Ca, Mide Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, Tiroid Ca, Mesane Ca
2	ENSG00000259001	AL355075.4	6,182	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
3	ENSG00000285972	CERNA2	5,412	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca
4	ENSG00000273576	AC009283.1	5,242	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca
5	ENSG00000234459	AC002064.2	5,155	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
6	ENSG00000224707	E2F3-IT1	4,963	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
7	ENSG00000261543	AC010931.2	4,887	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
8	ENSG00000265943	AC090912.1	4,860	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Osteosarkom, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma
9	ENSG00000130600	H19	4,807	Artmış	Bilinen	Birçok kanser, kalp hastalıkları, diyabet, depresyon, Huntington
10	ENSG00000275216	AL161431.1	4,641	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
11	ENSG00000287986	AL135841.1*	4,561	Artmış	Novel	

12	ENSG00000261474	AC026471.4	4,523	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
13	ENSG00000269888	AC112491.1	4,488	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
14	ENSG00000278408	AC108861.1	4,485	Artmış	Bilinen	Alzheimer Hastalığı, Meme Ca, Over Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatoselluler Ca, Huntington Hastalığı ve kanserler
15	ENSG00000212461	AC078860.1	4,412	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
16	ENSG00000276571	AC002550.2	4,371	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
17	ENSG00000262979	AC124319.1*	4,258	Artmış	Novel	
18	ENSG00000272379	AL008729.2	4,214	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
19	ENSG00000227197	AC009365.3	4,211	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington
20	ENSG00000231295	AC004888.1	4,203	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington
21	ENSG00000229065	AL354893.2	4,149	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
22	ENSG00000249842	AC010486.3	4,136	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
23	ENSG00000261220	AC103706.1	4,017	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca

Hastanın over tümör dokusunun, sağlıklı ikizine ait over dokusu ve diğer sağlıklı kardeşin over dokusu ile karşılaştırılması sonucunda, tümörde ekspresyonu azalan 245 protein kodlayan genin ekspresyon durumu ve bunların değişim kat sayıları ($|\log_2 Fc| > 4$) Tablo 4-7’te verilmiştir. Karşılaştırılan doku örneklerinde ekspresyon düzeyindeki azalışın 4 ile 8 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-7).

Tablo 4-7:Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu azalan protein kodlayan genler (Grup 1)

No	Ensembl ID	Gen Adı	$\log_2 Fc$ Değeri	No2	Ensembl ID2	Gen Adı2	$\log_2 Fc$ Değeri2
1	ENSG00000199405	SNORA1B	-8,432218	124	ENSG00000106617	PRKAG2	-4,689579
2	ENSG00000201157	SNORA62	-6,114611	125	ENSG00000138639	ARHGAP24	-4,688239

3	ENSG00000114784	EIF1B	-7,722082	126	ENSG00000115590	IL1R2	-4,68109
4	ENSG00000074706	IPCEF1	-7,541228	127	ENSG00000008324	SS18L2	-4,671979
5	ENSG00000120910	PPP3CC	-7,491845	128	ENSG00000197712	FAM114A1	-4,666994
6	ENSG00000108924	HLF	-7,484205	129	ENSG00000169184	MN1	-4,651481
7	ENSG00000170899	GSTA4	-7,064036	130	ENSG00000137726	FXYP6	-4,640858
8	ENSG00000123560	PLP1	-6,851143	131	ENSG00000140400	MAN2C1	-4,640511
9	ENSG00000197324	LRP10	-6,847661	132	ENSG00000169855	ROBO1	-4,627811
10	ENSG00000162747	FCGR3B	-6,815018	133	ENSG00000164828	SUN1	-4,602001
11	ENSG00000121851	POLR3GL	-6,463776	134	ENSG00000011465	DCN	-4,589892
12	ENSG00000267221	C17orf113	-6,444398	135	ENSG00000157502	PWWP3B	-4,587207
13	ENSG00000146070	PLA2G7	-6,435348	136	ENSG00000104375	STK3	-4,581345
14	ENSG00000151376	ME3	-6,368064	137	ENSG00000176788	BASP1	-4,58068
15	ENSG00000121964	GTDC1	-6,354769	138	ENSG00000117707	PROX1	-4,579629
16	ENSG00000285218	AC026316.4	-6,330013	139	ENSG00000178573	MAF	-4,57677
17	ENSG00000182983	ZNF662	-6,312922	140	ENSG00000104321	TRPA1	-4,567785
18	ENSG00000175745	NR2F1	-6,279865	141	ENSG00000159388	BTG2	-4,566184
19	ENSG00000141012	GALNS	-6,279814	142	ENSG00000091844	RGS17	-4,551466
20	ENSG00000132170	PPARG	-6,239399	143	ENSG00000131018	SYNE1	-4,551441
21	ENSG00000164124	TMEM144	-6,235567	144	ENSG00000121671	CRY2	-4,549993
22	ENSG00000107242	PIP5K1B	-6,234575	145	ENSG00000117643	MAN1C1	-4,535774
23	ENSG00000047056	WDR37	-6,192532	146	ENSG00000162341	TPCN2	-4,534417
24	ENSG00000144802	NFKBIZ	-5,967326	147	ENSG00000108587	GOSR1	-4,52724
25	ENSG00000169255	B3GALNT1	-5,967251	148	ENSG00000112208	BAG2	-4,515317
26	ENSG00000253873	PCDHGA11	-5,960662	149	ENSG00000144218	AFF3	-4,508622
27	ENSG00000132950	ZMYM5	-5,929834	150	ENSG00000143353	LYPLAL1	-4,506512
28	ENSG00000158578	ALAS2	-5,907348	151	ENSG00000204316	MRPL38	-4,504569
29	ENSG00000159147	DONSON	-5,886895	152	ENSG00000135063	FAM189A2	-4,501759
30	ENSG00000184056	VPS33B	-5,863281	153	ENSG00000128272	ATF4	-4,493971
31	ENSG00000171444	MCC	-5,811071	154	ENSG00000172243	CLEC7A	-4,492574
32	ENSG00000115468	EFHD1	-5,779688	155	ENSG00000147408	CSGALNACT1	-4,491955
33	ENSG00000244734	HBB	-5,736246	156	ENSG00000034693	PEX3	-4,482778
34	ENSG00000160818	GPATCH4	-5,723408	157	ENSG00000064042	LIMCH1	-4,482228
35	ENSG00000197442	MAP3K5	-5,696299	158	ENSG00000185551	NR2F2	-4,480065
36	ENSG00000170962	PDGFD	-5,652544	159	ENSG00000087095	NLK	-4,457813
37	ENSG00000163463	KRTCAP2	-5,642856	160	ENSG00000128191	DGCR8	-4,44757
38	ENSG00000173535	TNFRSF10C	-5,624979	161	ENSG00000164125	GASK1B	-4,446635
39	ENSG00000087903	RFX2	-5,597059	162	ENSG00000034152	MAP2K3	-4,443472
40	ENSG00000270106	TSNAX-DISC1	-5,569112	163	ENSG00000082074	FYB1	-4,432453
41	ENSG00000180660	MAB21L1	-5,527692	164	ENSG00000139679	LPAR6	-4,427007
42	ENSG00000163220	S100A9	-5,523462	165	ENSG00000188295	ZNF669	-4,422358
43	ENSG00000118777	ABCG2	-5,51124	166	ENSG00000130653	PNPLA7	-4,420667
44	ENSG00000163563	MNDA	-5,484337	167	ENSG00000165914	TTC7B	-4,416398
45	ENSG00000259040	BLOC1S5-TXNDC5	-5,477088	168	ENSG00000094631	HDAC6	-4,382003
46	ENSG00000186675	MAGEE2	-5,446114	169	ENSG00000140403	DNAJA4	-4,374411

47	ENSG00000133574	GIMAP4	-5,435431	170	ENSG00000112541	PDE10A	-4,373447
48	ENSG00000128829	EIF2AK4	-5,398293	171	ENSG00000003436	TFPI	-4,366073
49	ENSG00000079385	CEACAM1	-5,38292	172	ENSG00000166265	CYYR1	-4,363187
50	ENSG00000185883	ATP6V0C	-5,379803	173	ENSG00000116741	RGS2	-4,355829
51	ENSG00000143546	S100A8	-5,36254	174	ENSG00000172403	SYNPO2	-4,347653
52	ENSG00000175482	POLD4	-5,358059	175	ENSG00000044459	CNTLN	-4,345805
53	ENSG00000175727	MLXIP	-5,351253	176	ENSG00000197405	C5AR1	-4,334029
54	ENSG00000076555	ACACB	-5,344095	177	ENSG00000011295	TTC19	-4,329039
55	ENSG00000159461	AMFR	-5,338271	178	ENSG00000120820	GLT8D2	-4,32707
56	ENSG00000143384	MCL1	-5,33477	179	ENSG00000142875	PRKACB	-4,321548
57	ENSG00000153246	PLA2R1	-5,330029	180	ENSG00000095794	CREM	-4,319098
58	ENSG00000174807	CD248	-5,318267	181	ENSG00000163606	CD200R1	-4,317358
59	ENSG00000154553	PDLIM3	-5,312803	182	ENSG00000213563	C8orf82	-4,308332
60	ENSG00000196778	OR52K1	-5,309559	183	ENSG00000267710	EDDM13	-4,300772
61	ENSG00000106479	ZNF862	-5,297804	184	ENSG00000167562	ZNF701	-4,293719
62	ENSG00000136574	GATA4	-5,257295	185	ENSG00000214534	ZNF705E	-4,292085
63	ENSG00000112303	VNN2	-5,221729	186	ENSG00000142515	KLK3	-4,288697
64	ENSG00000118762	PKD2	-5,201217	187	ENSG00000172578	KLHL6	-4,283505
65	ENSG00000173376	NDNF	-5,192481	188	ENSG00000150403	TMCO3	-4,281709
66	ENSG00000126214	KLC1	-5,1879	189	ENSG00000171051	FPR1	-4,264224
67	ENSG00000174348	PODN	-5,157497	190	ENSG00000134853	PDGFRA	-4,258898
68	ENSG00000135218	CD36	-5,146271	191	ENSG00000124440	HIF3A	-4,256938
69	ENSG00000143416	SELENBP1	-5,145226	192	ENSG00000164691	TAGAP	-4,243084
70	ENSG00000129562	DAD1	-5,126735	193	ENSG00000108590	MED31	-4,240571
71	ENSG00000170345	FOS	-5,125446	194	ENSG00000273841	TAF9	-4,237177
72	ENSG00000111077	TNS2	-5,109726	195	ENSG00000225830	ERCC6	-4,228068
73	ENSG00000134444	RELCH	-5,080821	196	ENSG00000188404	SELL	-4,226588
74	ENSG00000197381	ADARB1	-5,075272	197	ENSG00000126088	UROD	-4,214711
75	ENSG00000198498	TMA16	-5,072268	198	ENSG00000048740	CELF2	-4,207152
76	ENSG00000161904	LEMD2	-5,070275	199	ENSG00000140092	FBLN5	-4,205716
77	ENSG00000164330	EBF1	-5,062289	200	ENSG00000260230	FRRS1L	-4,202888
78	ENSG00000109906	ZBTB16	-5,059302	201	ENSG00000154263	ABCA10	-4,197604
79	ENSG00000180871	CXCR2	-5,044025	202	ENSG00000128045	RASL11B	-4,195355
80	ENSG00000125843	AP5S1	-5,041331	203	ENSG00000163464	CXCR1	-4,189844
81	ENSG00000164442	CITED2	-5,019122	204	ENSG00000065413	ANKRD44	-4,185402
82	ENSG00000254832	OR4A40P	-5,009696	205	ENSG00000150316	CWC15	-4,182148
83	ENSG00000127526	SLC35E1	-5,007869	206	ENSG00000198478	SH3BGRL2	-4,172452
84	ENSG00000136546	SCN7A	-4,999764	207	ENSG00000028203	VEZT	-4,168602
85	ENSG00000170949	ZNF160	-4,991355	208	ENSG00000133997	MED6	-4,165448
86	ENSG00000130726	TRIM28	-4,988869	209	ENSG00000169439	SDC2	-4,16347
87	ENSG00000124208	TMEM189- UBE2V1	-4,988482	210	ENSG00000254087	LYN	-4,162805
88	ENSG00000078747	ITCH	-4,984006	211	ENSG00000183287	CCBE1	-4,160024
89	ENSG00000110876	SELPLG	-4,971345	212	ENSG00000163221	S100A12	-4,154958
90	ENSG00000008441	NFIX	-4,966231	213	ENSG00000137834	SMAD6	-4,15011
91	ENSG00000082438	COBLL1	-4,954556	214	ENSG00000172171	TEFM	-4,149952

92	ENSG00000162545	CAMK2N1	-4,926187	215	ENSG00000206559	ZCWPW2	-4,145965
93	ENSG00000129518	EAPP	-4,913449	216	ENSG00000101365	IDH3B	-4,142701
94	ENSG00000071967	CYBRD1	-4,892478	217	ENSG00000130522	JUND	-4,141317
95	ENSG00000069535	MAOB	-4,892098	218	ENSG00000145780	FEM1C	-4,141019
96	ENSG00000183722	LHFPL6	-4,886939	219	ENSG00000162407	PLPP3	-4,137688
97	ENSG00000164292	RHOBTB3	-4,879852	220	ENSG00000122550	KLHL7	-4,136509
98	ENSG00000141480	ARRB2	-4,869946	221	ENSG00000096060	FKBP5	-4,135781
99	ENSG00000115380	EFEMP1	-4,859935	222	ENSG00000148175	STOM	-4,133969
100	ENSG00000120129	DUSP1	-4,858403	223	ENSG00000112319	EYA4	-4,131566
101	ENSG00000189184	PCDH18	-4,855953	224	ENSG00000176142	TMEM39A	-4,130065
102	ENSG00000160584	SIK3	-4,85067	225	ENSG00000090013	BLVRB	-4,128676
103	ENSG00000077454	LRCH4	-4,831301	226	ENSG00000153250	RBMS1	-4,127987
104	ENSG00000108176	DNAJC12	-4,828412	227	ENSG00000177054	ZDHHC13	-4,127665
105	ENSG00000176946	THAP4	-4,822148	228	ENSG00000035862	TIMP2	-4,122473
106	ENSG00000155962	CLIC2	-4,794951	229	ENSG00000198961	PJA2	-4,117924
107	ENSG00000005187	ACSM3	-4,793118	230	ENSG00000109572	CLCN3	-4,097492
108	ENSG00000149115	TNKS1BP1	-4,792201	231	ENSG00000147119	CHST7	-4,091375
109	ENSG00000179820	MYADM	-4,789531	232	ENSG00000116701	NCF2	-4,082427
110	ENSG00000145741	BTF3	-4,785262	233	ENSG00000177990	DPY19L2	-4,078405
111	ENSG00000176971	FIBIN	-4,778609	234	ENSG00000112096	SOD2	-4,070678
112	ENSG00000092051	JPH4	-4,767518	235	ENSG00000119535	CSF3R	-4,06896
113	ENSG00000126217	MCF2L	-4,763623	236	ENSG00000142784	WDTC1	-4,068895
114	ENSG00000149262	INTS4	-4,758015	237	ENSG00000154310	TNIK	-4,034821
115	ENSG00000134202	GSTM3	-4,754357	238	ENSG00000206172	HBA1	-4,034366
116	ENSG00000117525	F3	-4,74885	239	ENSG00000100504	PYGL	-4,02705
117	ENSG00000138134	STAMBPL1	-4,74803	240	ENSG00000204406	MBD5	-4,025227
118	ENSG00000136732	GYPC	-4,74661	241	ENSG00000153234	NR4A2	-4,024153
119	ENSG00000100372	SLC25A17	-4,73043	242	ENSG00000151491	EPS8	-4,020947
120	ENSG00000167081	PBX3	-4,730068	243	ENSG00000184470	TXNRD2	-4,006806
121	ENSG00000143878	RHOB	-4,716834	244	ENSG00000107562	CXCL12	-4,005221
122	ENSG00000214787	MS4A4E	-4,706732	245	ENSG00000213977	TAX1BP3	-4,001087
123	ENSG00000185379	RAD51D	-4,700221				

Hastanın over tümör dokusunun, sağlıklı ikizine ait over dokusu ve diğer sağlıklı kardeşin over dokusu ile karşılaştırılması sonucunda, tümörde ekspresyonu azalan 42 uzun kodlanmayan RNA(lncRNA) transkripti bulunmuş, bunların 27 tanesinin bilinen ve 15 tanesinin novel transkript olduğu belirlenmiştir. Bu lncRNA'lar, bunların değişim katsayıları ve hastalıklarla ilişki durumu [102] Tablo 4-8'da gösterilmiştir.

Tablo 4-8: Sağlıklı dokulara kıyasla over tümör dokusunda ekspresyonu azalan LncRNA'lar (* Novel transkript) (Grup 1)

No	Ensembl ID	Gen Adı	log2 Fc Değeri	Ekspresyon Durumu	Gen Tipi	Hastalık İlişkisi
1	ENSG00000261544	AC011939.2*	-9,054	Azalmış	Novel transkript	
2	ENSG00000271815	AC008897.3	-8,970	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
3	ENSG00000248222	AC011389.1	-8,798	Azalmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid CA, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington, Şizofreni
4	ENSG00000271882	AP001330.4*	-8,264	Azalmış	Novel transkript	
5	ENSG00000277587	AC008759.3	-8,198	Azalmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Melanoma, Osteosarkom, Alzheimer, Huntington
6	ENSG00000275327	AL354950.2	-8,115	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
7	ENSG00000269919	AL022067.1*	-7,821	Azalmış	Novel transkript	
8	ENSG00000207258	AC016813.1	-7,759	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
9	ENSG00000234604	AL021068.1	-7,706	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
10	ENSG00000264932	AC115989.1*	-7,691	Azalmış	Novel transkript	
11	ENSG00000261824	LINC00662	-7,674	Azalmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Melanoma, Osteosarkom, Alzheimer, Huntington
12	ENSG00000236709	DAPK1-IT1	-7,556	Azalmış		
13	ENSG00000258400	AL591767.1	-7,527	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
14	ENSG00000239317	AC091959.1*	-7,316	Azalmış	Novel transkript	
15	ENSG00000278050	AP000944.3*	-7,292	Azalmış	Novel transkript	
16	ENSG00000264421	AC007448.3*	-7,164	Azalmış	Novel transkript	
17	ENSG00000283457	AC087565.2*	-6,990	Azalmış	Novel transkript	
18	ENSG00000267106	ZNF561-AS1	-6,977	Azalmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Melanoma, Nöroblastoma, Alzheimer,

					Huntington,
19	ENSG0000 0232693	AC012370. 1*	-6,926	Azalmış	Novel transkript
20	ENSG0000 0277135	AC012409. 3	-6,915	Azalmış	Bilinen Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolonorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Melanoma, Osteosarkom, Alzheimer, Huntington,
21	ENSG0000 0245711	NADK2- AS1	-6,767	Azalmış	Bilinen Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolonorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Melanoma, Osteosarkom, Alzheimer, Huntington,
22	ENSG0000 0256557	AC009509. 4	-6,767	Azalmış	Bilinen Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
23	ENSG0000 0228536	LYPLAL1- AS1	-6,758	Azalmış	Bilinen Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
24	ENSG0000 0228540	AC073326. 1*	-6,758	Azalmış	Novel transkript
25	ENSG0000 0250015	AC018752. 1	-6,696	Azalmış	Bilinen Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolonorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Tiroid Ca, Mesane Ca,
26	ENSG0000 0260630	SNAI3-AS1	-6,680	Azalmış	Bilinen Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Kolonorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Melanoma, Osteosarkom, Alzheimer, Huntington,
27	ENSG0000 0272842	AL391834. 1	-6,676	Azalmış	Bilinen Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
28	ENSG0000 0183535	COL18A1- AS1	-6,424	Azalmış	Bilinen Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
29	ENSG0000 0268987	AC011462. 3*	-6,359	Azalmış	Novel transkript
30	ENSG0000 0267061	AC090213. 1*	-6,344	Azalmış	Novel transkript
31	ENSG0000 0259363	AC090825. 1	-6,302	Azalmış	Bilinen Meme Ca, Over Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
32	ENSG0000 0237851	AL023584. 2	-6,298	Azalmış	Bilinen Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
33	ENSG0000 0267766	AC022726. 1*	-6,277	Azalmış	Novel transkript
34	ENSG0000 0237438	CECR7	-6,275	Azalmış	Bilinen Hepatosellüler Karsinoma
35	ENSG0000 0273076	AL021707. 7	-6,205	Azalmış	Bilinen Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
36	ENSG0000 0047056	WDR37	-6,192	Azalmış	Bilinen Akut Miyeloid Lösemi

37	ENSG00000280295	AC099811.6*	-6,171	Azalmış	Novel transkript	
38	ENSG00000241684	ADAMTS9-AS2	-6,149	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
39	ENSG00000239213	NCK1-DT	-6,115	Azalmış		
40	ENSG00000272369	AC008035.1	-6,086	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
41	ENSG00000253811	AC136424.2	-6,058	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
42	ENSG00000258461	AC012651.1*	-6,056	Azalmış	Novel transkript	

Hastanın periferik kanının, sağlıklı ikiz kardeşinin periferik kanı ve diğer sağlıklı kardeşinin periferik kanı ile karşılaştırılması sonucunda, hastada 39 ekspresyonu artan protein kodlayan gen tespit edilmiş, bu genler ile değişim kat sayıları ($|\log_2 F_c| > 2$) Tablo 4-9’da verilmiştir. Bu proteinlerden 5 tanesi “novel protein” olarak veri tabanlarında yer almaktadır. Karşılaştırılan periferik kan örneklerinde ekspresyon düzeyindeki artışın 2 ile 4 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: Sağlıklı PK örneklerine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu artan protein kodlayan genler (*Novel genler) (Grup 2)

No	Ensembl ID	Gen Adı	$\log_2 F_c$ Değeri	Ekspresyon Durumu
1	ENSG00000169429	CXCL8	3,84647811	Hastada ekspresyonu artmış
2	ENSG00000078140	UBE2K	3,32677979	Hastada ekspresyonu artmış
3	ENSG00000244165	P2RY11	3,04392696	Hastada ekspresyonu artmış
4	ENSG00000158050	DUSP2	2,5877519	Hastada ekspresyonu artmış
5	ENSG00000153234	NR4A2	2,99996966	Hastada ekspresyonu artmış
6	ENSG00000120738	EGR1	2,91009871	Hastada ekspresyonu artmış
7	ENSG00000173598	NUDT4	2,7169198	Hastada ekspresyonu artmış
8	ENSG00000165410	CFL2	2,60728657	Hastada ekspresyonu artmış
9	ENSG00000181029	TRAPPC5	2,60550026	Hastada ekspresyonu artmış
10	ENSG00000061938	TNK2	2,51327496	Hastada ekspresyonu artmış
11	ENSG00000166405	RIC3	2,50122613	Hastada ekspresyonu artmış
12	ENSG00000197728	RPS26	2,48105494	Hastada ekspresyonu artmış
13	ENSG00000167995	BEST1	2,45909091	Hastada ekspresyonu artmış
14	ENSG00000171223	JUNB	2,3214038	Hastada ekspresyonu artmış
15	ENSG00000267368	UPK3BL1	2,31970452	Hastada ekspresyonu artmış
16	ENSG00000090104	RGS1	2,29244279	Hastada ekspresyonu artmış
17	ENSG00000105835	NAMPT	2,27381032	Hastada ekspresyonu artmış
18	ENSG00000161835	TAMALIN	2,25649395	Hastada ekspresyonu artmış
19	ENSG00000177606	JUN	2,23536684	Hastada ekspresyonu artmış

20	ENSG00000118503	TNFAIP3	2,21509954	Hastada ekspresyonu artmış
21	ENSG00000112245	PTP4A1	2,21020368	Hastada ekspresyonu artmış
22	ENSG00000123689	G0S2	2,17946763	Hastada ekspresyonu artmış
23	ENSG00000163812	ZDHHC3	2,14225782	Hastada ekspresyonu artmış
24	ENSG00000204514	ZNF814	2,12534894	Hastada ekspresyonu artmış
25	ENSG00000242114	MTFP1	2,11245155	Hastada ekspresyonu artmış
26	ENSG00000141562	NARF	2,10192971	Hastada ekspresyonu artmış
27	ENSG00000070495	JMJD6	2,09032556	Hastada ekspresyonu artmış
28	ENSG00000110848	CD69	2,08315872	Hastada ekspresyonu artmış
29	ENSG00000248672	LY75-CD302	2,07473158	Hastada ekspresyonu artmış
30	ENSG00000184205	TSPYL2	2,06988657	Hastada ekspresyonu artmış
31	ENSG00000129255	MPDU1	2,05825865	Hastada ekspresyonu artmış
32	ENSG00000096433	ITPR3	2,05493042	Hastada ekspresyonu artmış
33	ENSG00000186111	PIP5K1C	2,03192343	Hastada ekspresyonu artmış
34	ENSG00000207181	SNORA14B	2,02396163	Hastada ekspresyonu artmış
35	ENSG00000285827	AP001267.5 *	3,31008195	Hastada ekspresyonu artmış
36	ENSG00000249624	AP000295.1*	3,18612184	Hastada ekspresyonu artmış
37	ENSG00000286235	AL035461.3*	2,22596618	Hastada ekspresyonu artmış
38	ENSG00000283580	AC098484.3*	2,1969616	Hastada ekspresyonu artmış
39	ENSG00000285446	Z84488.1*	2,07259325	Hastada ekspresyonu artmış

Hastanın PK örneğinin, sağlıklı ikiz kardeşinin PK örneği ve diğer sağlıklı kardeşinin PK örneği ile karşılaştırılması sonucunda, hastada 9 ekspresyonu artan lncRNA tespit edilmiş, bunların 3 tanesinin daha önce bildirilmemiş novel transkript olduğu, 6 tanesinin ise bilinen hastalık ilişkili lncRNA'lar olduğu belirlenmiştir. Bu lncRNA'lar, bunların ekspresyon değişim kat sayıları ($|\log_2 Fc| > 2$) ve ilişkili olduğu hastalıklar bilgisi Tablo 4-10'da verilmiştir. Karşılaştırılan periferik kan örneklerinde ekspresyon düzeyindeki artışın 2 ile 3 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: Sağlıklı PK örneğine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu artan lncRNA'lar (*Novel transkript) (Grup 2)

Ensembl ID	Gen Adı	log2 Fc Değeri	Ekspresyon Durumu	Gen tipi	Hastalık ilişkisi
ENSG00000232891	AL450344.3*	3,228	Artmış	novel transkript	
ENSG00000251405	AC016571.1*	3,166	Artmış	novel transkript	
ENSG00000270141	TERC	3,030	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Pankreas Ca, Mide Ca, Osteosarkom, Tiroid Ca, Akciğer Ca, kanserlerin birçoğunda, Tip1 /2 diyabet, Parkinson, Huntington, Alzheimer, yaşlanma...

ENSG00000270066	AL356488.2	2,859	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Osteosarkom, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG00000249249	AC010226.1	2,459	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Nöroblastoma, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Şizofreni, Alzheimer
ENSG00000278356	AC005911.1*	2,411	Artmış	novel transkript	
ENSG00000276997	AL513314.2	2,277	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Osteosarkom, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington
ENSG00000269952	AL117336.1	2,252	Artmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, Hepatosellüler Ca, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Huntington, Alzheimer
ENSG00000234361	AL391863.2	2,232	Artmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca

Hastanın periferik kanının, sağlıklı ikizine ait periferik kanı ve diğer sağlıklı kardeşin periferik kanı ile karşılaştırılması sonucunda, hastada ekspresyonu azalan 29 protein kodlayan gen ve bunların değişim kat sayıları ($|\log_2 F_c| > 2$) Tablo 4-11’de verilmiştir. Karşılaştırılan doku örneklerinde ekspresyon düzeyindeki azalışın 2 ile 3 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-11).

Tablo 4-11:Sağlıklı PK örneklerine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu azalan protein kodlayan genler (Grup 2)

No	Ensembl ID	Gen Adı	$\log_2 F_c$ Değeri	Ekspresyon Durumu
1	ENSG00000213186	TRIM59	-3,2568539	Hastada ekspresyonu azalmış
2	ENSG00000109911	ELP4	-3,1206563	Hastada ekspresyonu azalmış
3	ENSG00000211895	IGHA1	-3,1159485	Hastada ekspresyonu azalmış
4	ENSG00000278249	SCARNA2	-3,0830494	Hastada ekspresyonu azalmış
5	ENSG00000242259	C22orf39	-2,9765033	Hastada ekspresyonu azalmış
6	ENSG00000144182	LIPT1	-2,8067944	Hastada ekspresyonu azalmış
7	ENSG00000139537	CCDC65	-2,5509575	Hastada ekspresyonu azalmış
8	ENSG00000198502	HLA-DRB5	-2,4139843	Hastada ekspresyonu azalmış
9	ENSG00000118939	UCHL3	-2,3910881	Hastada ekspresyonu azalmış
10	ENSG00000197798	FAM118B	-2,3348608	Hastada ekspresyonu azalmış
11	ENSG00000217643	PTGES3P2	-2,3290155	Hastada ekspresyonu azalmış
12	ENSG00000113971	NPHP3	-2,3177258	Hastada ekspresyonu azalmış
13	ENSG00000164008	C1orf50	-2,2406058	Hastada ekspresyonu azalmış

14	ENSG00000104064	GABPB1	-2,1965014	Hastada ekspresyonu azalmış
15	ENSG00000107796	ACTA2	-2,1934724	Hastada ekspresyonu azalmış
16	ENSG00000251201	TMED7-TICAM2	-2,1607994	Hastada ekspresyonu azalmış
17	ENSG00000158555	GDPD5	-2,1442139	Hastada ekspresyonu azalmış
18	ENSG00000215472	RPL17-C18orf32	-2,1279104	Hastada ekspresyonu azalmış
19	ENSG00000064225	ST3GAL6	-2,1107632	Hastada ekspresyonu azalmış
20	ENSG00000211701	TRGV1	-2,0954921	Hastada ekspresyonu azalmış
21	ENSG00000162994	CLHC1	-2,0902931	Hastada ekspresyonu azalmış
22	ENSG00000162757	C1orf74	-2,0869146	Hastada ekspresyonu azalmış
23	ENSG00000186272	ZNF17	-2,0833453	Hastada ekspresyonu azalmış
24	ENSG00000121957	GPSM2	-2,0814787	Hastada ekspresyonu azalmış
25	ENSG00000200538	U3	-2,0759475	Hastada ekspresyonu azalmış
26	ENSG00000170364	SETMAR	-2,0692436	Hastada ekspresyonu azalmış
27	ENSG00000103415	HMOX2	-2,0669488	Hastada ekspresyonu azalmış
28	ENSG00000252448	SNORA63	-2,0385532	Hastada ekspresyonu azalmış
29	ENSG00000115446	UNC50	-2,0257938	Hastada ekspresyonu azalmış

Hastanın PK örneğinin, sağlıklı ikiz kardeşinin PK örneğiyle diğer sağlıklı kardeşinin PK örneği ile karşılaştırılması sonucunda, hastada 9 ekspresyonu azalan lncRNA tespit edilmiş, bunların 5 tanesinin daha önce bildirilmemiş novel transkript olduğu, 4 tanesinin ise bilinen hastalık ilişkili lncRNA'lar olduğu belirlenmiştir. Bu lncRNA'lar, bunların ekspresyon değişim kat sayıları ($|\log_2 F_c| > 2$) ve ilişkili olduğu hastalıklar bilgisi Tablo 4-12'de verilmiştir. Karşılaştırılan PK örneklerinde ekspresyon düzeyindeki azalışın 2 ile 4 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-7).

Tablo 4-12: Sağlıklı PK örneklerine kıyasla hastanın PK örneğinde ekspresyonu azalan lncRNA'lar (*Novel transkript) (Grup 2)

No	Ensembl ID	Gen Adı	log2 Fc Değeri	Ekspresyon Durumu	Gen tipi	Hastalık ilişkisi
1	ENSG00000274525	AC008443.6	-3,784	Azalmış	Bilinen	Meme Ca, Over Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Osteosarkom, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Huntington, Alzheimer
2	ENSG00000263327	TAPT1-AS1	-2,551	Azalmış	Bilinen	Astrositoma, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
3	ENSG00000285596	AC017116.2*	-2,307	Azalmış	novel transkript	-
4	ENSG00000257925	AC008083.2	-2,220	Azalmış	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid, Mesane Ca
5	ENSG00000229930	AC138393.2*	-2,169	Azalmış	novel transkript	-

6	ENSG00000244055	AC007566.1*	-2,158	Azalmış	novel transkript	-
7	ENSG00000253522	MIR3142HG	-2,066	Azalmış	Bilinen	Servikal, Lenfoma, Malign Melanoma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
8	ENSG00000247137	AP000873.2*	-2,027	Azalmış	novel transkript	-
9	ENSG00000255186	AC087277.2*	-2,026	Azalmış	novel transkript	-

Hastanın kan örneği ile tümör dokusunun arasındaki değişimin birebir kıyaslaması sonucunda, elde edilen ekspresyon verisi aşağıda yer almaktadır. Burada kana kıyasla dokudaki değişime bakılmış ve kodlayan genlerden ekspresyonu artan 82 gen (Tablo 4-13), ekspresyonu artan 27 lncRNA (Tablo 4-14) ile kodlayan genlerden ekspresyonu azalan 93 gen (Tablo 4-15) ile ekspresyonu azalan 23 lncRNA (Tablo 4-16) tablolarında gösterilmiştir. Dokuda ekspresyon düzeyindeki artışın 7 ile 20 kat arasında değiştiği gözlenmiştir (Tablo 4-13).

Tablo 4-13 : Hastanın periferik kanına göre dokusunda ekspresyonu yüksek görünen kodlayan genler (Grup 3)

No	Ensembl ID	Gen Adı	Log2 Fc Değeri	Ekspresyon Durumu
1	ENSG00000200320	SNORA63	20,4056046	Dokuda ekspresyonu artmış
2	ENSG00000212588	SNORA26	12,9507407	Dokuda ekspresyonu artmış
3	ENSG00000181143	MUC16	12,8010574	Dokuda ekspresyonu artmış
4	ENSG00000269028	MTRNR2L12	12,4817609	Dokuda ekspresyonu artmış
5	ENSG00000252699	SNORA21B	12,2785391	Dokuda ekspresyonu artmış
6	ENSG00000207166	SNORA68	11,9013322	Dokuda ekspresyonu artmış
7	ENSG00000003989	SLC7A2	11,8997929	Dokuda ekspresyonu artmış
8	ENSG00000117069	ST6GALNAC5	11,6399503	Dokuda ekspresyonu artmış
9	ENSG00000201229	SNORA63D	10,7352832	Dokuda ekspresyonu artmış
10	ENSG00000207145	SNORA18	10,2555702	Dokuda ekspresyonu artmış
11	ENSG00000222489	SNORA79B	10,1803369	Dokuda ekspresyonu artmış
12	ENSG00000270617	URGCP-MRPS24	10,1620145	Dokuda ekspresyonu artmış
13	ENSG00000167244	IGF2	9,94388792	Dokuda ekspresyonu artmış
14	ENSG00000116039	ATP6V1B1	9,85070879	Dokuda ekspresyonu artmış
15	ENSG00000137821	LRRC49	9,53196919	Dokuda ekspresyonu artmış
16	ENSG00000275994	SNORA24	9,49576526	Dokuda ekspresyonu artmış
17	ENSG00000228055	FAM245A	9,25075357	Dokuda ekspresyonu artmış
18	ENSG00000113594	LIFR	9,17162288	Dokuda ekspresyonu artmış
19	ENSG00000170500	LONRF2	9,05155833	Dokuda ekspresyonu artmış
20	ENSG00000199293	SNORA21	8,96866337	Dokuda ekspresyonu artmış
21	ENSG00000278274	SNORA61	8,75803077	Dokuda ekspresyonu artmış

22	ENSG00000209582	SNORA48	8,68306673	Dokuda ekspresyonu artmış
23	ENSG00000146648	EGFR	8,67857041	Dokuda ekspresyonu artmış
24	ENSG00000123095	BHLHE41	8,64015994	Dokuda ekspresyonu artmış
25	ENSG00000284491	THSD8	8,59985997	Dokuda ekspresyonu artmış
26	ENSG00000202363	SNORA62	8,52835152	Dokuda ekspresyonu artmış
27	ENSG00000189337	KAZN	8,52041445	Dokuda ekspresyonu artmış
28	ENSG00000221716	SNORA11	8,51723908	Dokuda ekspresyonu artmış
29	ENSG00000198185	ZNF334	8,50443453	Dokuda ekspresyonu artmış
30	ENSG00000253051	SNORA31B	8,48527727	Dokuda ekspresyonu artmış
31	ENSG00000111319	SCNN1A	8,41989445	Dokuda ekspresyonu artmış
32	ENSG00000221303	SNORA79	8,3265994	Dokuda ekspresyonu artmış
33	ENSG00000201643	SNORA14A	8,21856752	Dokuda ekspresyonu artmış
34	ENSG00000225091	SNORA71A	8,16343608	Dokuda ekspresyonu artmış
35	ENSG00000165949	IFI27	8,0817087	Dokuda ekspresyonu artmış
36	ENSG00000112981	NME5	8,06358129	Dokuda ekspresyonu artmış
37	ENSG00000145362	ANK2	8,04604265	Dokuda ekspresyonu artmış
38	ENSG00000238917	SNORD10	8,0240397	Dokuda ekspresyonu artmış
39	ENSG00000154096	THY1	8,02150581	Dokuda ekspresyonu artmış
40	ENSG00000104413	ESRP1	8,00730706	Dokuda ekspresyonu artmış
41	ENSG00000183833	CFAP91	7,9318872	Dokuda ekspresyonu artmış
42	ENSG00000151338	MIPOL1	7,89893297	Dokuda ekspresyonu artmış
43	ENSG00000187079	TEAD1	7,88364333	Dokuda ekspresyonu artmış
44	ENSG00000066468	FGFR2	7,87658111	Dokuda ekspresyonu artmış
45	ENSG00000278527	SNORD22	7,82337021	Dokuda ekspresyonu artmış
46	ENSG00000146038	DCDC2	7,81784098	Dokuda ekspresyonu artmış
47	ENSG00000185499	MUC1	7,81779697	Dokuda ekspresyonu artmış
48	ENSG00000254726	MEX3A	7,79098265	Dokuda ekspresyonu artmış
49	ENSG00000137648	TMPRSS4	7,75342837	Dokuda ekspresyonu artmış
50	ENSG00000206838	SNORA5A	7,7279366	Dokuda ekspresyonu artmış
51	ENSG00000079337	RAPGEF3	7,64318196	Dokuda ekspresyonu artmış
52	ENSG00000113657	DPYSL3	7,6159444	Dokuda ekspresyonu artmış
53	ENSG00000114115	RBP1	7,60474651	Dokuda ekspresyonu artmış
54	ENSG00000221420	SNORA81	7,59638887	Dokuda ekspresyonu artmış
55	ENSG00000109846	CRYAB	7,59289442	Dokuda ekspresyonu artmış
56	ENSG00000239559	RPL37P2	7,54643959	Dokuda ekspresyonu artmış
57	ENSG00000164692	COL1A2	7,53531293	Dokuda ekspresyonu artmış
58	ENSG00000104879	CKM	7,53098489	Dokuda ekspresyonu artmış
59	ENSG00000138771	SHROOM3	7,51328367	Dokuda ekspresyonu artmış
60	ENSG00000253869	PIGFP1	7,47897676	Dokuda ekspresyonu artmış
61	ENSG00000099260	PALMD	7,44222525	Dokuda ekspresyonu artmış
62	ENSG00000125398	SOX9	7,43008261	Dokuda ekspresyonu artmış
63	ENSG00000169604	ANTXR1	7,42641054	Dokuda ekspresyonu artmış
64	ENSG00000162738	VANG2	7,41648421	Dokuda ekspresyonu artmış
65	ENSG00000208797	SNORD73A	7,41390602	Dokuda ekspresyonu artmış
66	ENSG00000106078	COBL	7,41052345	Dokuda ekspresyonu artmış

67	ENSG00000046604	DSG2	7,40405449	Dokuda ekspresyonu artmış
68	ENSG00000178826	TMEM139	7,38165841	Dokuda ekspresyonu artmış
69	ENSG00000200959	SNORA74A	7,36048009	Dokuda ekspresyonu artmış
70	ENSG00000263961	RHEX	7,34994381	Dokuda ekspresyonu artmış
71	ENSG00000064655	EYA2	7,33408946	Dokuda ekspresyonu artmış
72	ENSG00000104067	TJP1	7,29613788	Dokuda ekspresyonu artmış
73	ENSG00000113645	WWC1	7,24943396	Dokuda ekspresyonu artmış
74	ENSG00000163879	DNALI1	7,20877713	Dokuda ekspresyonu artmış
75	ENSG00000135373	EHF	7,10817983	Dokuda ekspresyonu artmış
76	ENSG00000162105	SHANK2	7,10769844	Dokuda ekspresyonu artmış
77	ENSG00000135480	KRT7	7,07294703	Dokuda ekspresyonu artmış
78	ENSG00000278704	BX004987.1	7,05061242	Dokuda ekspresyonu artmış
79	ENSG00000076716	GPC4	7,01764757	Dokuda ekspresyonu artmış
80	ENSG00000176641	RNF152	7,00655758	Dokuda ekspresyonu artmış
81	ENSG00000188659	SAXO2	7,00482471	Dokuda ekspresyonu artmış
82	ENSG00000111799	COL12A1	7,00228299	Dokuda ekspresyonu artmış

Tablo 4-14: Hastanın kanına göre dokusunda ekspresyonu yüksek görünen lncRNA'lar (*Novel transkript) (Grup 3)

Ensembl ID	Gen Adı	Log2Fc Değeri	Ekspresyon Durumu	Gen Tipi	Hastalık İlişkisi
ENSG00000283128	AC009403.2*	12,392	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG00000281383	FP671120.7*	12,301	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG00000130600	H19	12,211	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Aterosklerozis, Mesane Ca, Kanser, Kalp fibroblast çoğalması ve fibrozis, Servikal Ca, KML, Kolon Ca, Kolorektal Ca, Endometrium Ca, Birçok kanser.
ENSG00000281181	FP236383.5*	12,176	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG00000280614	FP236383.4*	12,157	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG00000280800	FP671120.6*	12,136	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG00000235244	DANT2	9,75	Dokuda yüksek	lncRNA	
ENSG00000265943	AC090912.1	9,454	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Nöroblastoma, Osteosarkom, Alzheimer, Huntington
ENSG00000224843	LINC00240	9,303	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington

ENSG0000 0227733	AC239809. 3	9,134	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Kolonorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Glioma, Melanoma, NSCLC, Nöroblastoma, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington
ENSG0000 0287966	AL590062. 1	8,738	Dokuda yüksek	lncRNA	
ENSG0000 0180525	PRR26	8,632	Dokuda yüksek	Bilinen	Hepatosellüler Ca
ENSG0000 0177640	CASC2	8,409	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca
ENSG0000 0233237	LINC00472	8,281	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca
ENSG0000 0273308	AC024560. 3	8,27	Dokuda yüksek	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG0000 0271394	7SK	8,189	Dokuda yüksek	miscRNA	
ENSG0000 0279050	PWAR1	8,169	Dokuda yüksek	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG0000 0257178	AC103702. 1	8,168	Dokuda yüksek	lncRNA	
ENSG0000 0175772	LINC01106	7,856	Dokuda yüksek	Bilinen	Astrositoma, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG0000 0260108	AC026464. 2*	7,836	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG0000 0249669	CARMN	7,769	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Lenfoma, Malign Glioma, Melanoma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington
ENSG0000 0137693	YAP1	7,766	Dokuda yüksek	Bilinen	Mide Ca, Karaciğer Ca,
ENSG0000 0261438	AL157394. 1	7,711	Dokuda yüksek	lncRNA	
ENSG0000 0204588	LINC01123	7,659	Dokuda yüksek	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Lenfoma, Malign Glioma, Melanoma, NSCLC, Nöroblastoma, Nöroblastoma, pankreatik ductal adeno., Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzhemier, Huntington, type2 diabet, sizofreni
ENSG0000 0241472	PTPRG- AS1	7,329	Dokuda yüksek	Bilinen	Astrositoma, Meme Ca, Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG0000 0259644	AC022613. 3*	7,078	Dokuda yüksek	novel transkript	
ENSG0000 0214049	UCA1	7,068	Dokuda yüksek	Bilinen	birçok kanserde over exp.

Tablo 4-15:Hastanın kanına göre dokusunda ekspresyonu düşük görünen kodlayan genler

No	Ensembl ID	Gen Adı	Log2Fc Değeri	No	Ensembl ID	Gen Adı	Log2Fc Değeri
1	ENSG00000085265	FCN1	-11,055	48	ENSG00000154310	TNIK	-7,77247
2	ENSG00000237580	GCSHP3	-10,671	49	ENSG00000101265	RASSF2	-7,74416
3	ENSG00000009694	TENM1	-10,506	50	ENSG00000284842	FAM91A2P	-7,72021
4	ENSG00000163736	PPBP	-10,454	51	ENSG00000134539	KLRD1	-7,71628
5	ENSG00000167895	TMC8	-10,384	52	ENSG00000149781	FERMT3	-7,70414
6	ENSG00000262246	CORO7	-10,284	53	ENSG00000168497	CAVIN2	-7,70178
7	ENSG00000170684	ZNF296	-10,259	54	ENSG00000163492	CCDC141	-7,64877
8	ENSG00000143546	S100A8	-10,076	55	ENSG00000159842	ABR	-7,64719
9	ENSG00000180089	TMEM86B	-9,9173	56	ENSG00000258571	PTTG4P	-7,637
10	ENSG00000127152	BCL11B	-9,7043	57	ENSG00000255508	AP002990.1	-7,62405
11	ENSG00000160593	JAML	-9,6774	58	ENSG00000106003	LFNG	-7,56503
12	ENSG00000122224	LY9	-9,6467	59	ENSG00000168421	RHOH	-7,55532
13	ENSG00000130592	LSP1	-9,4506	60	ENSG00000090376	IRAK3	-7,53405
14	ENSG00000182162	P2RY8	-9,3948	61	ENSG00000186469	GNG2	-7,52166
15	ENSG00000170989	S1PR1	-9,1616	62	ENSG00000141524	TMC6	-7,51263
16	ENSG00000172548	NIPAL4	-9,1576	63	ENSG00000107099	DOCK8	-7,49084
17	ENSG00000188404	SELL	-9,1171	64	ENSG00000162894	FCMR	-7,48309
18	ENSG00000069966	GNB5	-9,1059	65	ENSG00000136250	AOAH	-7,48105
19	ENSG00000113263	ITK	-8,9372	66	ENSG00000077044	DGKD	-7,4686
20	ENSG00000183918	SH2D1A	-8,8892	67	ENSG00000167207	NOD2	-7,44617
21	ENSG00000101162	TUBB1	-8,8115	68	ENSG00000124731	TREM1	-7,41259
22	ENSG00000136286	MYO1G	-8,8092	69	ENSG00000160255	ITGB2	-7,39805
23	ENSG00000140968	IRF8	-8,7613	70	ENSG00000278616	BEND3P3	-7,39702
24	ENSG00000138378	STAT4	-8,7476	71	ENSG00000124575	H1-3	-7,2522
25	ENSG00000117091	CD48	-8,6397	72	ENSG00000105639	JAK3	-7,243
26	ENSG00000074370	ATP2A3	-8,6185	73	ENSG00000118507	AKAP7	-7,23055
27	ENSG00000166501	PRKCB	-8,5518	74	ENSG00000060069	CTDP1	-7,23038
28	ENSG00000254838	GVINP1	-8,5287	75	ENSG00000090382	LYZ	-7,22234
29	ENSG00000115607	IL18RAP	-8,483	76	ENSG00000211899	IGHM	-7,20635
30	ENSG00000277734	TRAC	-8,4781	77	ENSG00000197872	CYRIA	-7,2052
31	ENSG00000116741	RGS2	-8,4633	78	ENSG00000184588	PDE4B	-7,19658
32	ENSG00000135604	STX11	-8,45	79	ENSG00000118596	SLC16A7	-7,17635
33	ENSG00000151702	FLI1	-8,4394	80	ENSG00000130475	FCHO1	-7,13513
34	ENSG00000277437	FP671120.2	-8,4282	81	ENSG00000164398	ACSL6	-7,09822
35	ENSG00000115165	CYTIP	-8,4236	82	ENSG00000154822	PLCL2	-7,09781
36	ENSG00000135218	CD36	-8,2513	83	ENSG00000091592	NLRP1	-7,09548
37	ENSG00000072786	STK10	-8,2105	84	ENSG00000110876	SELPLG	-7,07459
38	ENSG00000102879	CORO1A	-8,1561	85	ENSG00000225217	HSPA7	-7,06327
39	ENSG00000168685	IL7R	-8,1464	86	ENSG00000150672	DLG2	-7,04929

40	ENSG00000144218	AFF3	-8,1015	87	ENSG00000172673	THEMIS	-7,04285
41	ENSG00000213731	RAB5CP1	-8,0343	88	ENSG00000073756	PTGS2	-7,01091
42	ENSG00000164483	SAMD3	-7,999	89	ENSG00000276027	RNU12	-7,00611
43	ENSG00000198624	CCDC69	-7,9111	90	ENSG00000188906	LRRK2	-7,00175
44	ENSG00000256069	A2MP1	-7,9076	91	ENSG00000169896	ITGAM	-6,99431
45	ENSG00000211870	TRAJ19	-7,8129	92	ENSG00000065413	ANKRD44	-6,9792
46	ENSG00000180448	ARHGAP45	-7,8049	93	ENSG00000041353	RAB27B	-6,96785
47	ENSG00000213809	KLRK1	-7,7882				

Tablo 4-16: Hastanın kanına göre dokusunda ekspresyonu düşük görünen lncRNA'lar (*Novel transkript)

Ensembl ID	Gen Adı	Log2Fc Değeri	Ekspresyon Durumu	Gen Tipi	Hastalık İlişkisi
ENSG00000272446	AL158850.1	-14,950	Dokuda düşük	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Servikal Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Malign Glioma, Melanoma, Nöroblastoma, NSCLC, Osteosarkom, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca, Alzheimer, Huntington
ENSG00000225864	AL645939.2	-10,228	Dokuda düşük	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG00000075884	ARHGAP15	-9,544	Dokuda düşük	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG00000077238	IL4R	-9,203	Dokuda düşük	Bilinen	Nazal Polipler
ENSG00000262202	AC007952.4*	-9,09	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000231758	ARHGAP15-AS1	-9,058	Dokuda düşük	lnc	
ENSG00000280439	AC004836.1	-8,868	Dokuda düşük	TEC	
ENSG00000236525	AC007278.2*	-8,818	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000059804	SLC2A3	-8,802	Dokuda düşük	Bilinen	Nazal Polipler
ENSG00000249806	AC139720.1	-8,749	Dokuda düşük	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG00000277437	FP671120.2	-8,428	Dokuda düşük	miRNA	
ENSG00000269578	AC008764.7*	-7,581	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000276250	AC127024.6	-7,568	Dokuda düşük	Bilinen	Over Ca, Meme Ca, Prostat Ca, Kolorektal Ca, Hepatosellüler Ca, Akciğer Ca, Lenfoma, Alzheimer, Huntington
ENSG00000259834	AL365361.1*	-7,538	Dokuda düşük	novel transkript	

ENSG00000260997	AC004847.1*	-7,536	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000259073	FOXN3-AS2	-7,516	Dokuda düşük	Bilinen	Servikal Ca, Lenfoma, Malign Melanoma, Malign Glioma, NSCLC, Mide Ca, Tiroid Ca, Mesane Ca
ENSG00000077044	DGKD	-7,468	Dokuda düşük	Bilinen	Nazal Polipler
ENSG00000279187	AC027601.4	-7,465	Dokuda düşük	TEC	
ENSG00000280028	AC007431.3	-7,322	Dokuda düşük	TEC	
ENSG00000267554	AC015911.8*	-7,313	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000287979	AC253572.1*	-7,212	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000273368	AC006566.1*	-7,178	Dokuda düşük	novel transkript	
ENSG00000283045	AC103703.1*	-7,020	Dokuda düşük	novel transkript	

Hastanın over tümör dokusunun, sağlıklı ikizine ait over dokusu ve diğer sağlıklı kardeşin over dokusu ile karşılaştırılması; hastanın periferik kan sonucunun diğer sağlıklı PK örnekleri ile karşılaştırması; hastanın tümör dokusunun PK örneği ile karşılaştırılması sonucunda ortak olarak ekspresyon değişimi dikkat çekici durumda olan miRNA'lar tablo 4-17'de gösterilmiştir. Burada doku karşılaştırması sonucu tümör dokusunda ekspresyonu yüksek 2 miRNA (MIR4256, MIR1206), ekspresyonu düşük 4 miRNA (MIR611, MIR4761, MIR3648-1, MIR3648-2); kan karşılaştırması sonucunda hastada ekspresyonu yüksek 2 miRNA (MIR616, MIR6821), ekspresyonu düşük 1 miRNA(MIR4718) tespit edilmiştir.

Tablo 4-17: 3 karşılaştırma sonucunda ortak ekspresyon değişim gösteren miRNA'lar

Ensembl ID	Gen Adı	log2 Fc Değeri	Ekspresyon Durumu	Uzunluk (bç)
ENSG00000283296	MIR4256	7,0063	Tümörde ekspresyonu artmış	64
ENSG00000283200	MIR1206	4,2105	Tümörde ekspresyonu artmış	59
ENSG00000284108	MIR611	-16,5010	Tümörde ekspresyonu azalmış	67
ENSG00000284031	MIR4761	-12,7166	Tümörde ekspresyonu azalmış	82
ENSG00000275708	MIR3648-1	-9,5627	Tümörde ekspresyonu azalmış	180
ENSG00000264462	MIR3648-2	-8,6350	Tümörde ekspresyonu azalmış	180
ENSG00000208028	MIR616	3,2734	Kanda ekspresyonu artmış	97
ENSG00000276753	MIR6821	2,4966	Kanda ekspresyonu artmış	74
ENSG00000264733	MIR4718	-2,2935	Kanda ekspresyonu azalmış	51

4.4. GO Analiz Sonuçları

Sağlıklı dokulara kıyasla tümör dokusunda ekspresyonu anlamlı düzeyde değişen protein kodlayan genlerin, hücresel ve moleküler süreçlerde yer aldığı kategorilerin gösterildiği GO ve yolak analizlerinin belirlendiği KEGG çalışması yapılmıştır. Bu analizlerde yanlış eşleşme oranı (FDR) filtrelemesi yapıldıktan sonra (Enrichment FDR<0,05) oluşturulan tablolar aşağıda yer almaktadır (Tablo 4.18-20).

Tümör dokusunda ekspresyonu yüksek olan genlerin (Tablo 4-5), GO analiz sonucu Tablo 4-18'de gösterilmiştir. Doku karşılaştırmasında, tümör dokusunda ekspresyonu azalan genlerin (Tablo 4-7), GO analiz sonucu Tablo 4-19'de gösterilmiştir. Periferik kan örneklerinin kıyaslanması sonucunda, hastanın periferik kanında ekspresyonu yüksek olarak belirlenen genlerin (Tablo 4-9), GO analiz sonucu Tablo 4-20'de yer almaktadır. Bu analiz aşamasında uygulanan Enrichment FDR (enrichment FDR<0,05) filtrelemesi sonucunda anlamlı değerler tablolarda gösterildiği için, hastanın periferik kan örneğinde ekspresyonu azalan genler için GO analiz sonuçları anlamlı olarak tespit edilmemiştir.

Tablo 4-18: Tümör dokusunda ekspresyonu yüksek olan genlerin GO analiz sonucu

Kategori	Enrichment FDR*	Fonksiyonel Kategori	Genler
GO BP	0,0148	Kas filamentı sliding	MYL1 MYL2 ACTA1 TPM2
	0,0148	Aktin-myosin filamentı sliding	MYL1 MYL2 ACTA1 TPM2
	0,019	Böbrek gelişiminde rol oynayan epitel hücre farklılaşması	PAX8 ACTA2 CD24 PODXL
	0,0193	Mitokondriyal elektron taşınması (sitokrom c'den oksijene)	COX6A1 COX6B1 COX8A
	0,0193	Aerobik elektron taşıma zinciri	COX6A1 COX6B1 COX8A
	0,0207	Böbrek gelişiminde rol oynayan epitel hücre farklılaşması	PAX8 ACTA2 CD24 PODXL
	0,0278	Mezenkimal göçü	ACTA2 ACTA1
	0,0324	Aerobik elektron taşıma zinciri	COX6A1 ETFRF1 NDUFA1 COX6B1 COX8A
	0,0324	Mikrovillus yerleşiminin düzenlenmesi	KLF5 PODXL
	0,0499	Humoral bağışıklık tepkisi	SCARA3 KLK7 CXCL10 SLPI SERPING1 CLU LCN2
	0,0499	Antimikrobiyal humoral yanıt	KLK7 CXCL10 SLPI CLU LCN2
	0,0499	Nefron gelişimi	PAX8 TACSTD2 ACTA2 CD24 PODXL
GO CC			CP WFDC2 PARP4 ACTA2 FOLR1 DNPH1 ATP6V1B1 SLC2A1 CLU SLPI PODXL RAB25 CRABP2 ACTA1 MAL2 LCN2 SERPING1 MUC16 TACSTD2 MUC1 THSD4 MB TXNDC5 SCNN1A
	0,0053	Hücre dışı/ekstraselüler organel	COX6B1 COX8A COX6A1
	0,0053	Solunum zinciri kompleksi IV	CP WFDC2 PARP4 ACTA2 FOLR1 DNPH1 ATP6V1B1 SLC2A1 CLU SLPI PODXL RAB25 CRABP2 ACTA1 MAL2 LCN2 SERPING1 MUC16 TACSTD2 MUC1 THSD4 MB TXNDC5 SCNN1A
	0,0053	Ekstraselüler eksozom	CP WFDC2 PARP4 ACTA2 FOLR1 DNPH1 ATP6V1B1 SLC2A1 CLU SLPI PODXL RAB25 CRABP2 ACTA1 MAL2 LCN2 SERPING1 MUC16 TACSTD2 MUC1 THSD4 MB TXNDC5 SCNN1A
	0,0053	Ekstraselüler vezikül	SLC34A2 MUC1 FOLR1 SCNN1A ATP6V1B1 SLC2A1 PODXL MAL2
	0,0054	Apikal plazma zarı	ACTA1 ACTA2 MYL2 SLC2A1 MYL1 TPM2
	0,0106	Kontraktil lif bölümü	SLC34A2 MUC1 FOLR1 SCNN1A ATP6V1B1 SLC2A1 PODXL MAL2
	0,0106	Hücrenin apikal kısmı	

0,0106	Sitokrom kompleksi	COX6B1 COX8A COX6A1
0,0106	Kan mikropartikülü	CP SLC2A1 CLU ACTA1 SERPING1
0,0133	Ekstrasellüler boşluk	CP WFDC2 PARP4 ACTA2 FOLR1 DNPH1 ATP6V1B1 SLC2A1 CLU SLPI PODXL RAB25 CRABP2 ACTA1 MAL2 LCN2 SERPING1 MUC16 TACSTD2 MUC1 THSD4 MB TXNDC5 SCARA3 RSPO1 CXCL10 SCNN1A CKM KLK7
0,0133	Kontraktil lif	MYL2 ACTA1 MYL1 ACTA2 SLC2A1 TPM2
0,0193	Solunum zinciri kompleksi	COX6B1 COX8A NDUFA1 COX6A1
0,0268	Ekstrasellüler bölge kısmı	CP WFDC2 PARP4 ACTA2 FOLR1 DNPH1 ATP6V1B1 SLC2A1 CLU SLPI PODXL RAB25 CRABP2 ACTA1 MAL2 LCN2 SERPING1 MUC16 TACSTD2 MUC1 THSD4 MB TXNDC5 SCARA3 RSPO1 CXCL10 SCNN1A CKM KLK7
0,0268	Solunum zinciri	COX6B1 COX8A NDUFA1 COX6A1
0,0279	Sarkomer	ACTA1 MYL2 SLC2A1 MYL1 TPM2
0,0319	Plazma zarının dış tarafının bağlantılı bileşeni	FOLR1 CD24
0,0372	Myofibril	MYL2 ACTA1 MYL1 SLC2A1 TPM2
0,045	Plazma zarının dış tarafının içsel bileşeni	FOLR1 CD24
GO MF		
0,013	Sitokrom-c oksidaz aktivitesi	COX6A1 COX8A COX6B1
0,013	Heme-copper terminal oksidaz aktivitesi	COX6A1 COX8A COX6B1
0,013	Bir demir donör grubuna etki eden oksidoredüktaz aktivitesi	COX6A1 COX8A COX6B1
0,013	Oksidoredüktaz aktivitesi	COX6A1 COX8A COX6B1
0,0305	Kasın yapısal bileşeni	MYL2 MYL1 TPM2
BP: Biyolojik Proses, CC: Hücresel Komponent, MF: Moleküler Fonksiyon *FDR<0,05		

Tablo 4-19: Tümör dokusunda ekspresyonu düşük olan genlerin GO analiz sonucu

Kategori	Enrichment FDR	Fonksiyonel Kategori	Genler
GO BP	5,901E-05	Toksik maddeye tepki	HDAC6 GSTM3 RHOB MAP3K5 HBA1 HBB MAOB IPCEF1 RGS17 TRPA1 SOD2 RGS2 DUSP1 ATF4 CD36 FBLN5 S100A8 EPS8 NR4A2 CLIC2 S100A9 FOS PDGFD TXNRD2 ERCC6 LYN
	9,326E-05	Oksidatif strese tepki	ATF4 MAP3K5 HDAC6 PDGFRA RHOB FOS HBA1 ERCC6 HBB TRPA1 SOD2 DUSP1 CD36 FBLN5 MCL1 NR4A2 PDGFD PLA2R1 IPCEF1 GATA4 PKD2 NCF2 TXNRD2
	9,326E-05	Reaktif oksijen türlerine tepki	HDAC6 PDGFRA RHOB FOS MAP3K5 HBA1 HBB TRPA1 SOD2 DUSP1 CD36 FBLN5 PDGFD ERCC6 PKD2 TXNRD2
	0,0006	Hücre göçü	CXCL12 RHOB CXCR1 SDC2 PDGFD CD248 CXCR2 DCN CEACAM1 SELPLG PROX1 PPARG PDGFRA S100A8 PLA2G7 S100A9 ROBO1 NDNF PODN ADARB1 CSF3R EPS8 NR4A2 SUN1 CCBE1 NR2F2 SELL C5AR1 LYN MAP2K3 LIMCH1 HDAC6 SOD2 DUSP1 ARRB2 CITED2 MCC MYADM CD200R1 F3 GYPC PLPP3 S100A12
	0,0006	Oksidatif strese hücrel yanıt	ATF4 MAP3K5 HDAC6 PDGFRA RHOB FOS SOD2 CD36 FBLN5 MCL1 NR4A2 PDGFD PLA2R1 GATA4 PKD2 NCF2 TXNRD2
	0,0021	Hücrel detoksifikasyon	GSTM3 IPCEF1 SOD2 CD36 FBLN5 CLIC2 S100A9 TXNRD2 HBA1 HBB
	0,0021	Hücre ölümünün pozitif düzenlenmesi	TNFRSF10C LYN HDAC6 SOD2 F3 PPARG S100A8 S100A9 MAP3K5 HBA1 HBB STK3 ZBTB16 DUSP1 ATF4 ARRB2 MCL1 RHOB FOS CD248 CXCR2 CD36 MND1 ROBO1 PPP3CC MCF2L
	0,0027	Toksik maddeye hücrel yanıt	HDAC6 GSTM3 RHOB MAP3K5 IPCEF1 SOD2 CD36 FBLN5 CLIC2 S100A9 PDGFD TXNRD2 HBA1 HBB
	0,0037	Hücre göçünün düzenlenmesi	CXCL12 RHOB PDGFD DCN CEACAM1 PROX1 PPARG PDGFRA PLA2G7 PODN ADARB1 CXCR2 CCBE1 C5AR1 LYN MAP2K3 LIMCH1 HDAC6 SOD2 DUSP1 PLPP3 CITED2 ROBO1 MCC MYADM NR2F2 CD200R1 F3
	0,0037	Hücre hareketliliği	CXCL12 RHOB CXCR1 SDC2 PDGFD CD248 CXCR2 DCN CEACAM1 SELPLG PROX1 PPARG PDGFRA S100A8 PLA2G7 S100A9 ROBO1 NDNF PODN ADARB1 CSF3R EPS8 NR4A2 SUN1 CCBE1 NR2F2 SELL C5AR1 LYN MAP2K3 LIMCH1 HDAC6 SOD2 DUSP1 ARRB2 CITED2 MCC MYADM CD200R1 F3 GYPC PLPP3 S100A12
	0,0037	Hücrenin lokalizasyonu	CXCL12 RHOB CXCR1 SDC2 PDGFD CD248 CXCR2 DCN CEACAM1 SELPLG PROX1 PPARG PDGFRA S100A8 PLA2G7 S100A9 ROBO1 NDNF PODN ADARB1 CSF3R EPS8 NR4A2 SUN1 CCBE1 NR2F2 SELL C5AR1 LYN MAP2K3 LIMCH1 HDAC6 SOD2 DUSP1 ARRB2 CITED2 MCC MYADM CD200R1 F3 GYPC PLPP3 S100A12
	0,0038	Myeloid lökosit göçü	CXCR1 CXCR2 CXCL12 S100A8 PLA2G7 S100A9 CSF3R PDGFD C5AR1 DUSP1 LYN CD200R1 S100A12

0,0038	Detoksifikasyon	GSTM3 IPCEF1 SOD2 CD36 FBLN5 CLIC2 S100A9 TXNRD2 HBA1 HBB
0,004	Hücresel oksidan detoksifikasyon	IPCEF1 SOD2 CD36 FBLN5 CLIC2 S100A9 TXNRD2 HBA1 HBB
0,0043	Kas hücresi apoptotik sürecinin pozitif düzenlenmesi	SOD2 ATF4 CXCR2 MAP3K5 PPARG
0,0043	Lökosit göçü	CXCR1 CXCR2 CXCL12 SELPLG S100A8 PLA2G7 S100A9 CSF3R EPS8 PDGFD SELL C5AR1 DUSP1 LYN CD200R1 CEACAM1 GYPC S100A12 SDC2
0,0048	İnorganik maddeye tepki	HDAC6 PKD2 RHOB MAP3K5 HBA1 HBB MAOB CYBRD1 TRPA1 SOD2 DUSP1 ATF4 JUND CD36 FBLN5 S100A8 FOS PDGFD FIBIN ERCC6 TXNRD2
0,0048	Oksijen içeren bileşiğe yanıt	JUND PPARG NR4A2 HDAC6 PKD2 PDGFRA SMAD6 RHOB FOS SELL MAP3K5 HBA1 HBB TFPI DCN MAOB TRPA1 CXCL12 SOD2 RGS2 DUSP1 CRY2 CD36 GATA4 FBLN5 WDTC1 S100A8 EPS8 BTG2 TPCN2 PDGFD FIBIN NR2F2 C5AR1 ERCC6 LYN ATF4 CEACAM1 MBD5 PRKACB CLEC7A TXNRD2 ATP6V0C
0,0054	Hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesi	ZDHC13 MAP2K3 PDE10A DUSP1 PDGFRA LPAR6 MCL1 EPS8 PDGFD MAP3K5 PJA2 TAF9 DCN CXCL12 ARRB2 S100A8 TNF CLIC2 S100A9 S100A12 C5AR1 LYN TIMP2 ITCH NLK STK3 RGS2 PKD2 MCF2L CD36 LEMD2 ERCC6 SOD2 F3 PLA2R1 SIK3 CAMK2N1 ROBO1 MYADM CEACAM1 GATA4 JPH4 PRKAG2 PIP5K1B ARHGAP24 RHOB TAGAP FPR1
0,0054	Hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesi	BTG2 LYN SOD2 PPARG MCC PODN ADARB1 TIMP2 ITCH STK3 MED31 ZBTB16 PROX1 DUSP1 CITED2 TAX1BP3 TNS2 SMAD6 CAMK2N1 MNDA ROBO1 NR2F2 CEACAM1 PKD2
0,0058	Kas hücresi apoptotik sürecinin düzenlenmesi	SOD2 ATF4 ARRB2 CXCR2 MAP3K5 PPARG GATA4
0,006	Hücre hareketliliğinin düzenlenmesi	CXCL12 RHOB PDGFD DCN CEACAM1 PROX1 PPARG PDGFRA PLA2G7 PODN ADARB1 CXCR2 CCBE1 C5AR1 LYN MAP2K3 LIMCH1 HDAC6 SOD2 DUSP1 PLPP3 CITED2 ROBO1 MCC MYADM NR2F2 CD200R1 F3
0,0064	Kimyasal homeostaz	LPAR6 CXCR1 FPR1 CXCR2 C5AR1 CLIC2 PKD2 TPCN2 JPH4 TRPA1 CRY2 ATF4 CD36 SCN7A GATA4 WDTC1 ALAS2 LYN DCN PYGL SOD2 PPARG PDGFRA MBD5 ACSM3 CYBRD1 CXCL12 CLCN3 ABCG2 PRKACB S100A8 S100A9 ATP6V0C
0,0068	Vasküler ilişkili düz kas hücresi apoptotik sürecinin pozitif düzenlenmesi	SOD2 ATF4 PPARG
0,0068	Kas hücresi apoptotik süreci	SOD2 ATF4 ARRB2 CXCR2 MAP3K5 PPARG GATA4
0,0068	Hücresel homeostaz	CLCN3 LPAR6 CXCR1 FPR1 CXCR2 TXNRD2 C5AR1 CLIC2 PKD2 TPCN2 JPH4 TRPA1 TNS2 ATF4 CD36 GATA4 WDTC1 ALAS2 LYN PDGFRA MCL1 CYBRD1 CXCL12 NCF2 ABCG2 S100A8 S100A9 POLD4 ATP6V0C

0,0068	Hücre göçünün negatif düzenlenmesi	DCN CXCL12 PPARG RHOB PODN ADARB1 LIMCH1 DUSP1 CITED2 ROBO1 MCC NR2F2 CD200R1
0,0068	Reaktif oksijen türlerine hücresele yanıt	HDAC6 PDGFRA RHOB FOS MAP3K5 SOD2 CD36 FBLN5 PDGFD PKD2
0,007	Oksijen radikaline tepki	SOD2 CD36 FBLN5 ERCC6 TXNRD2
0,0072	Oksidatif strese hücresele yanıtın düzenlenmesi	HDAC6 ATF4 CD36 FBLN5 MCL1 SOD2 GATA4
GO MF		
0,003	RAGE reseptör bağlanması	S100A12 S100A8 S100A9 FPR1
0,0037	Icosanoid bağlanma	S100A8 S100A9 PPARG
0,0037	Icosatetraenoic asit bağlanması	S100A8 S100A9 PPARG
0,0037	Araşidonik asit bağlanması	S100A8 S100A9 PPARG
0,0052	LBD alan bağlama	PPARG PROX1 CITED2
0,0087	İnterlökin-8 reseptör aktivitesi	CXCR1 CXCR2
0,0087	Kalsiyum salım kanalı aktivitesi	JPH4 TRPA1 PKD2 TPCN2
0,0107	Monokarboksilik asit bağlanması	PPARG PYGL NR2F2 ACACB S100A8 S100A9
0,0128	Antioksidan aktivite	SOD2 TXNRD2 HBA1 HBB CLIC2 S100A9 IPCEF1
0,0134	Protein alanına özgü bağlanma	CLCN3 ATF4 TRIM28 PPARG IPCEF1 NLK ZBTB16 ARRB2 MCL1 EBF1 SH3BGR2 LYN TNKS1BP1 CNTLN PROX1 PKD2 CITED2 SDC2 ROBO1 BASP1 MAP3K5 TAF9
0,0134	İnterlökin-8 bağlama	CXCR1 CXCR2
0,0134	Toll-like reseptör bağlanması	S100A8 S100A9 CD36
0,0134	DBD domain bağlama	PPARG PROX1
0,0134	Ligand kapılı kalsiyum kanal aktivitesi	JPH4 TRPA1 PKD2 TPCN2
0,0168	Uzun zincirli yağ asidi bağlama	S100A8 S100A9 PPARG
0,0183	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptör bağlanması	PDGFD LYN PDGFRA
0,0183	Hücre içi ligand kapılı iyon kanalı aktivitesi	JPH4 TRPA1 PKD2 TPCN2
0,0183	Oksijen taşıyıcı aktivitesi	HBA1 HBB IPCEF1
0,0183	Toll-like reseptör 4 bağlanması	S100A8 S100A9
0,0428	C-X-C kemokin bağlama	CXCR1 CXCR2

0,0471	Organik asit bağlama	PPARG HBA1 HBB PYGL NR2F2 ACACB S100A8 S100A9 ALAS2
BP: Biyolojik Proses, MF: Moleküler Fonksiyon		

Tablo 4-20: Hastanın kanında ekspresyonu yüksek olan genlerin GO analiz sonucu

Kategori	Enrichment FDR	Fonksiyonel Kategori	Genler
GO CC	0,002250892	Transkripsiyon Faktör AP-1 Kompleksi	JUNB JUN

4.5. KEGG Analiz Sonuçları

KEGG sonuçları, ekspresyon analizi sonucu dokuda ve kanda anlamlı değişimlere sahip olan genlerin hangi fonksiyonel yollarda rol oynadığını göstermektedir.

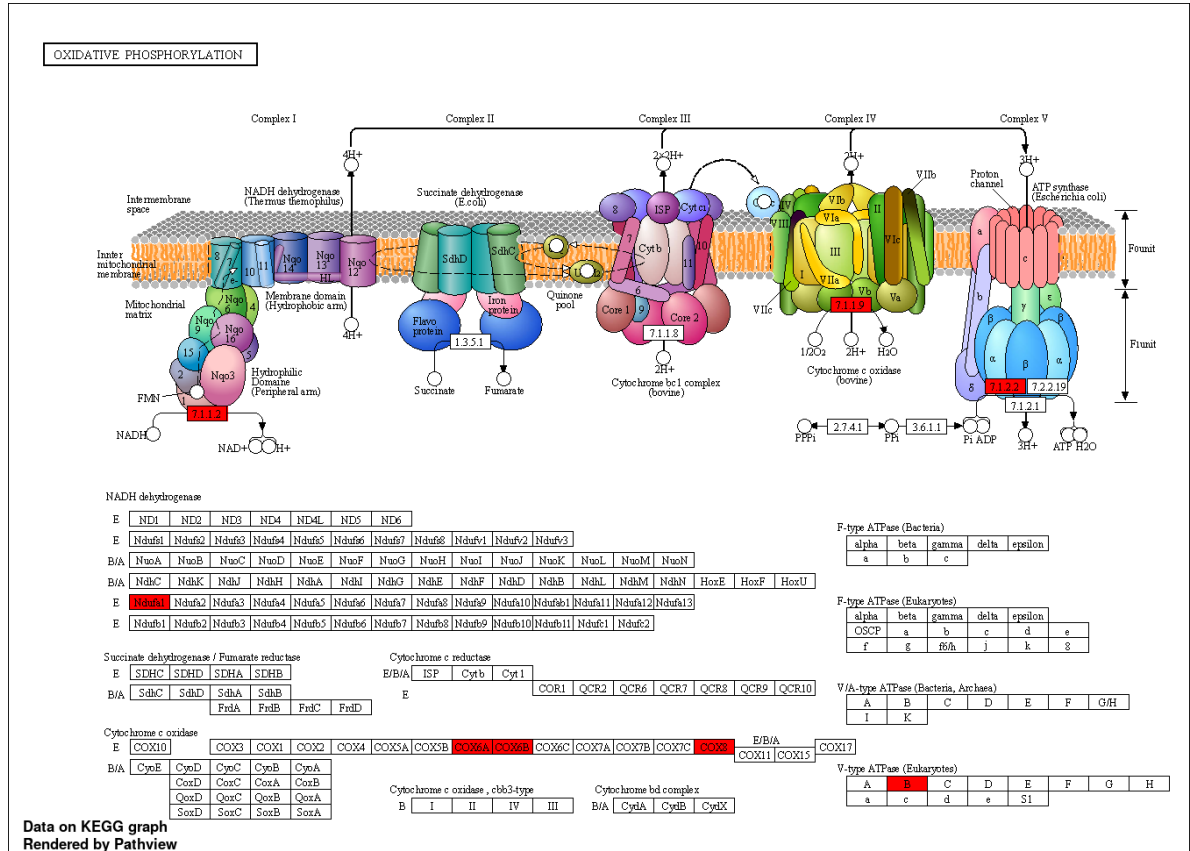
Tablo 4-21’de tümörde ekspresyonu artan ve azalan genler (Tablo 4-5 ve Tablo 4-7) ile hastanın periferik kan örneğinde ekspresyonu artan genlerin KEGG analiz sonuçları yer almaktadır. Sonuçlar Enrichment filtrelemesinden geçmiş ve FDR<0,05 değerinde olanlar güvenilir sonuçlar olarak burada gösterilmiştir.

Tablo 4-21: Ekspresyonu değişen genlerin KEGG sonuçları

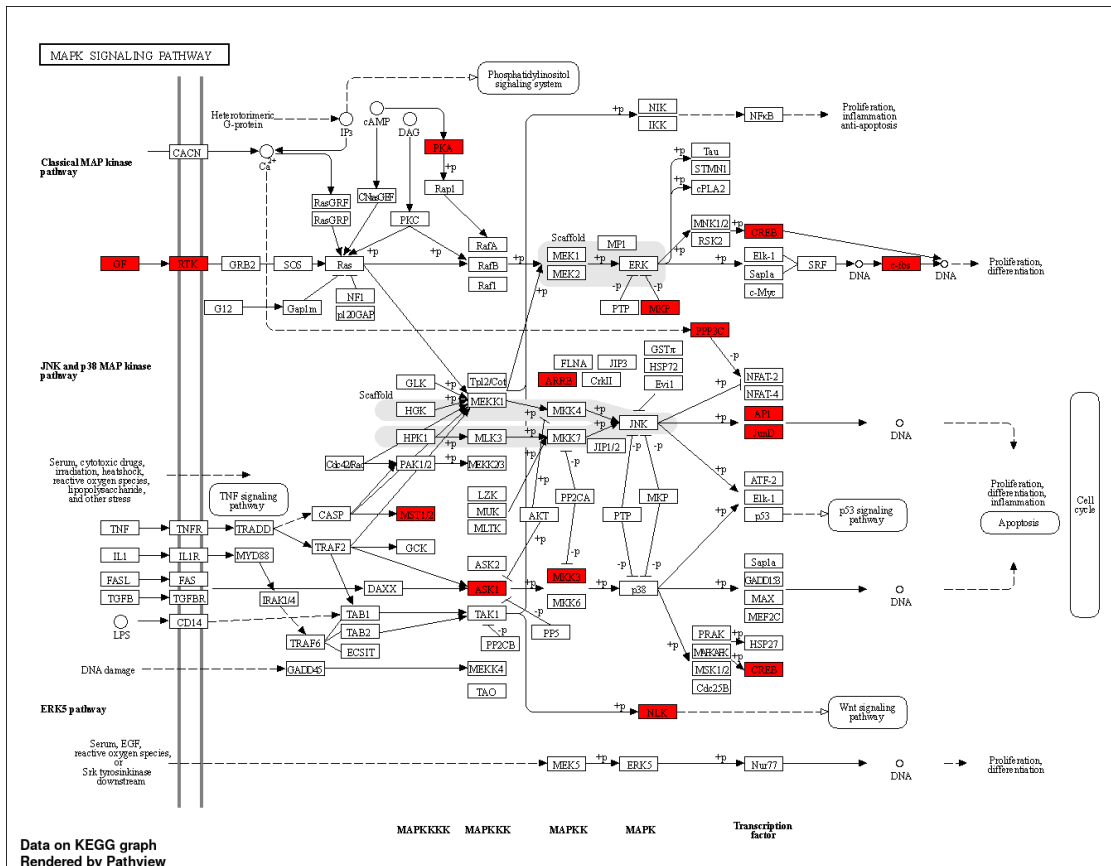
Tümörde ekspresyonu artan genlere ait KEGG analizi		
Enrichment FDR	Fonksiyonel Kategori	Genler
0,0015	Kalp kasi kasılması	COX6A1, COX6B1 COX8A MYL2 TPM2
0,0094	Oksidatif fosforilasyon	COX6A1, COX6B1 COX8A NDUFA1 ATP6V1B1
Tümörde ekspresyonu azalan genlere ait KEGG analizi		
Enrichment FDR	Fonksiyonel Kategori	Genler
0,0283	MAPK sinyal yolağı	DUSP1 FOS JUND ARRB2 MAP3K5 ATF4 PDGFRA NLK PPP3CC PRKACB MAP2K3 STK3 PDGFD
0,0283	Malaria/Sıtma	GYPC HBA1 HBB SDC2 CD36
0,0283	Ateroskleroz	DUSP1 FOS GSTA4 GSTM3 MAP3K5 NCF2 SDC2 IL1R2
Hasta kanında ekspresyonu artan genlere ait KEGG analizi		
Enrichment FDR	Fonksiyonel Kategori	Genler
0,0003	NOD-like reseptör sinyal yolağı	NAMPT CXCL8 ITPR3 JUN TNFAIP3
0,0044	IL-17 sinyal yolağı	CXCL8 JUN TNFAIP3
0,0044	TNF sinyal yolağı	JUN JUNB TNFAIP3
0,0044	GnRH sinyal yolağı	EGR1 ITPR3 JUN
0,0044	Paratiroid hormon sentezi, salgılanması ve etkisi	EGR1 ITPR3 NR4A2
0,0044	Diyabetik komplikasyonlarda AGE-RAGE sinyal yolağı	EGR1 CXCL8 JUN
0,0044	Pertussis/Boğmaca	CFL2 CXCL8 JUN
0,0174	Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirüs enfeksiyonu	CXCL8 ITPR3 JUN
0,0219	Helikobakter pylori enfeksiyonunda epitel hücre sinyali	CXCL8 JUN
0,0219	İnsan immün yetmezlik virüsü 1 enfeksiyonu	CFL2 ITPR3 JUN
0,0248	NF-kappa B sinyal yolağı	CXCL8 TNFAIP3
0,0248	Fosfatidilinositol sinyalizasyon sistemi	PIP5K1C ITPR3

0,0248	Toll-like reseptör sinyal yolağı	CXCL8 JUN
0,0248	C tipi lektin reseptörü sinyal yolağı	ITPR3 JUN
0,0248	Fc gamma R aracılı fagositoz	CFL2 PIP5K1C
0,0248	Aldosteron sentezi ve salgılanması	ITPR3 NR4A2
0,0248	Salmonella infeksiyonu	CXCL8 JUN
0,0248	Chagas hastalığı (Amerikan tripanozomiyazisi)	CXCL8 JUN
0,0248	Kanserde kolin metabolizması	PIP5K1C JUN
0,0248	Romatizmal eklem iltihabı	CXCL8 JUN
0,0338	Apoptozis	ITPR3 JUN
0,0338	Apelin sinyal yolağı	EGR1 ITPR3
0,0338	Osteoklast farklılaşması	JUN JUNB
0,0338	Östrojen sinyal yolağı	ITPR3 JUN
0,0338	Kızamık	JUN TNFAIP3
0,0361	Fosfolipaz D sinyal yolağı	PIP5K1C CXCL8
0,0361	Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD)	CXCL8 JUN
0,0366	Oksitosin sinyal yolu	ITPR3 JUN
0,038	Hücrel yaşlanma	CXCL8 ITPR3
0,038	Hepatit B	CXCL8 JUN

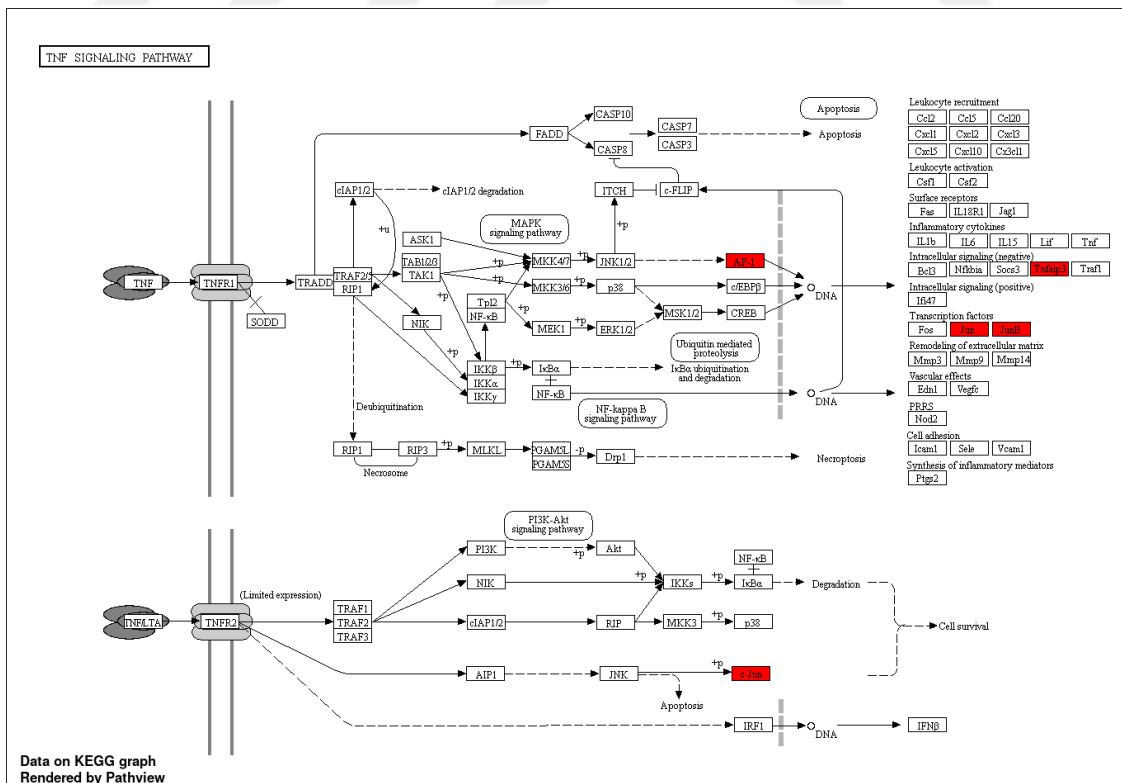
Tabloda gösterilen genlerin yolak üzerindeki pozisyonları ve diğer genler ile etkileşiminin gösterildiği yolak şemalarından birkaçı (Şekil 4.4-9) aşağıda yer almaktadır. Yolak üzerinde kırmızı ile gösterilen bu genlerin, up regülasyonu ya da down regülasyonu durumunda ilişki içinde oldukları genlerin de nasıl etkilenebileceği öngörülebilmektedir.



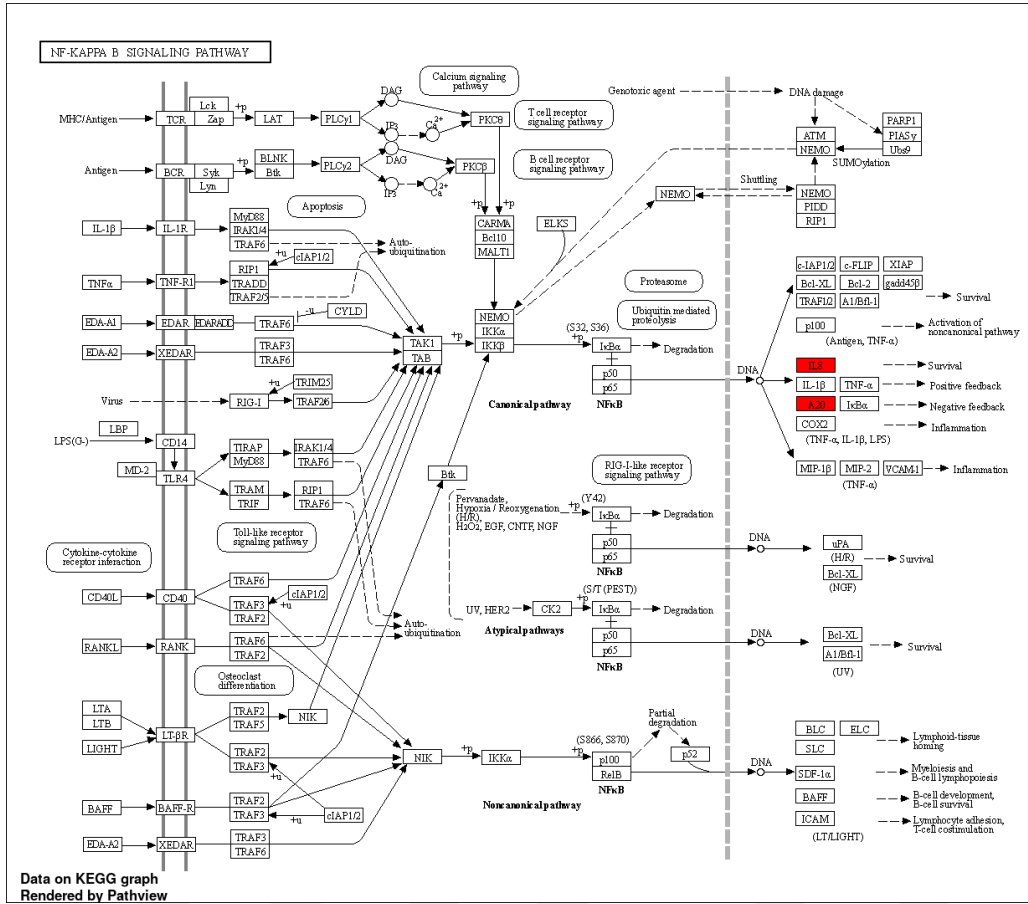
Şekil 4-4: Oksidatif Fosforilasyon Yolağı (KEGG)



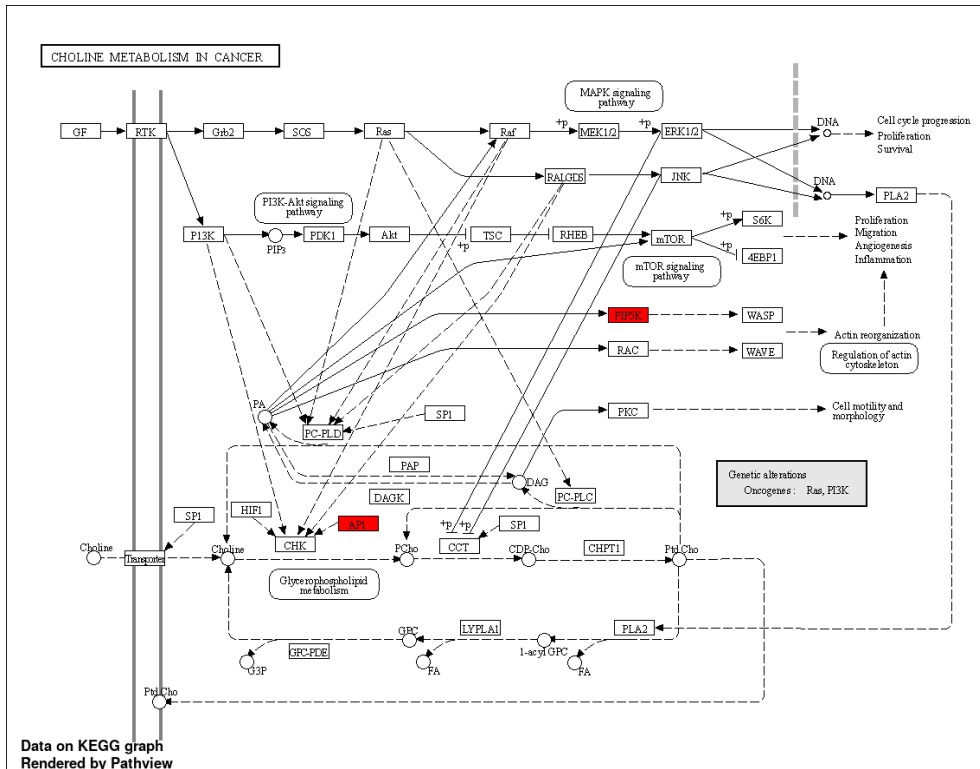
Şekil 4-5: MAPK Sinyal Yolağı (KEGG)



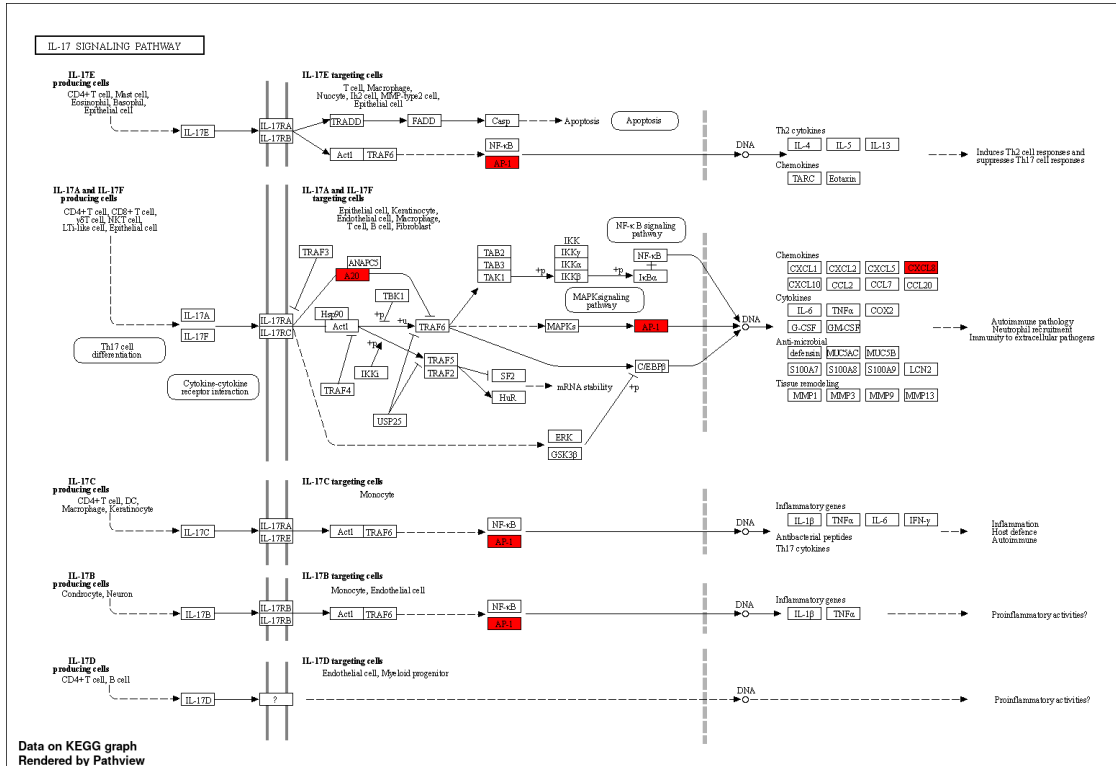
Şekil 4-6: TNF Sinyal Yolağı (KEGG)



Şekil 4-7: NF Kappa B Sinyal Yolağı (KEGG)



Şekil 4-8: Kanserde Kolin Metabolizması (KEGG)



Şekil 4-9: Interlökin-17 (IL-17) Sinyal Yolağı (KEGG)

4.6. Füzyon Gen Analizi Sonuçları

RNA-Seq analizinin bir diğer çıktısı olan füzyon gen analiz sonuçlarında, 50 baz 5' uçta ve 50 baz 3' uçta eşleşen dizilere göre füzyon gen analizi yapılmış ve yanlış pozitif olarak belirlenenlerin filtrelenmesinin ardından 'yeni tanımlanmış' olarak tespit edilenler Tablo 4-22'de verilmiştir.

Tablo 4-22: Füzyon Gen Analizi Sonuçları

Örnek Kodu	Gen 1 (5' füzyon gen partneri)	Gen 2 (3' füzyon gen)	Füzyon noktası 5'	Füzyon noktası 3'	Füzyon tanımı	Durum	Füzyon Dizisi
BR987	Füzyon saptanmamıştır.						
BR1432D	AC084782.1 (LncRNA)	NEAT1 (LncRNA)	15:56395688:-	11:65431659:+	lncrna,onkogen	muhtemelen yeni füzyon	TGTTCAACATCATTAGTTATTAGGGAAATGCAAAATCAAAA CCACAAT*GAGTGATGCTGAGCATCTTTTCATATGCTTACT GGTCATTGTATGTTGT
	HDAC7	SLC48A1	12:47782722:-	12:47782661:+		muhtemelen yeni füzyon	GAAGAAAATGGAAAAAATCTGAACAATAAATGTTTTAT TTGCTTTAAAA*GTGCCCTGCACACCCGCTTGACGCGCA CTGCTCACTTCTGGGGGGCCCT
BR1447	AC097500.1(Lnc RNA)	LINC01473	2:185950644:-	2:186086370:-	lncrna,	muhtemelen yeni füzyon	CCCAGCGAGATCAACCAGAAGCGGGTGATTCTGCAT TTCCAAGTGAAG*GAGTATTTTAAAGATCTAGTGTATATA AGGACAAGCCATTCTCAGTCA
	AC133555.6 (LncRNA)	SLC7A5	16:29613648:-	16:87869429:-	lncrna	muhtemelen yeni füzyon	ACAATCCTCGCTCGGCTCGGCTCTCGGGTGTCAGGCGCC CGGCCGGTAA*GCAGAGCATGGCGGGTGCGGGCCGAA GCGGCGCGCGCTAGCGGCGCCGG
	MALAT1	AKAP13	11:65499903:+	15:85653446:+	lncrna,onkogen, kanser, tümör,	muhtemelen yeni füzyon	TAGAAACAAGATAGAAAATGAAAATATTGTCAAGAGTTT CAGATAGAAAA*AAAAAATCTAGGAAATCGGATCCAC GGAAGTGGAAAAAGAAAGCCCT
BR1447D	AL109628.2 (LncRNA)	CMC1	14:39148800:+	3:28315954:+	lncrna,	muhtemelen yeni füzyon	CAGTCATGCATTGCTTAGCAAGGGGATACATTCTGAGA AATGCATCAT*TTGTTAAGCAGCCCATGATTGTACTGTTTC TCTACTAGAAATCCTATCT
	LINC02210_ (LncRNA)	TNS4	17:45638167:-	17:40476716:-	onkogen,	muhtemelen yeni füzyon	AAATACAAAATTTAGCTGGGCGTGGTGGCGGGCGCCTAT AGTCCCAGCTA*AAATTTGTATTTTGTAGTAGACAGGGT TTCACCATGTTGGCCAGGCTGG
	AC084782.1 (LncRNA)	NEAT1	15:56395685:-	11:65431659:+	lncrna,onkogen,	muhtemelen yeni füzyon	TGTTCAACATCATTAGTTATTAGGGAAATGCAAAATCAAAA CCACAATGAG*GAGTGATGCTGAGCATCTTTTCATATGCT TACTGGTCATTGTATGTTGT
	KCNQ5	ALK	6:72990587:+	2:29674134:-	bilinen,onkogen, kanser,tümör	muhtemelen yeni füzyon	CAGCTTAAGGAGATTTTGGGCTGAGACGATGGGTTTTTC TAGATAAACAA*TCAAATTGTCCTGTTTGCAGACGACAT GATTGTATATCTAGAAAACCCC
	MALAT1 (LncRNA)	ETV6	11:65502222:+	12:11787997:+	bilinen,onkogen, kanser,tümör	muhtemelen yeni füzyon	AAAGTATTGAACCTGGGGTTGGTCTGGCCTACTGGGCTG ACATTAACCTAC*AAATACGGGAGTAAGACACAATAAGAA AACATTTACAAGGAGTCCAGCCC
	AC074008.2 (LncRNA)	RASSF8	2:73352680:-	12:25973771:+	lncrna	muhtemelen yeni füzyon	CCACCTCTGGATTCAAGAAATGGCACCTTCTGTCTGTGC CTCATAGGT*AGAAGGTGCCATCCGTGAACCAAAAAGT GAGCCCTTGGCAGACACTGAT
	TRAB	RBBP7	14:21907146:-	X:16853414:-	kanser	muhtemelen yeni füzyon	TTGAACCTCTGGGCCACGCAATCCTCCTGAGTAGCTAGG ACTACAGGTG*GCTGAAGTGGGAGGATCACTATTATTTA GAAAAAAGAAAAGTACTAGTAT
BR3219	AC005670.3 (LncRNA)	AC091132.3 (LncRNA)	17:47034834:-	17:45532751:+	lncrna,resiprokal	muhtemelen yeni füzyon	CTGGTTAAGTATGGATTCTCAAACTAGGGCTTTAAATATC CTTCGTGATT*TTTTTTTGGCATGAAAATCTGAAGACCA CTGGTGGGCTCTGTACAAAG
	CTSS	DFFA	1:150731249:-	1:10460105:-	resiprokal	muhtemelen yeni füzyon	CTCTCGCCTCAGCCTCCGAGTAGCTGGAATTATAGGCGT GCACCAACAC*GCCCGCTAATTTTGTATTTTGTAGTAGA GACAGGGTTTGTACATTGG
	MALAT1	TLN1	11:65504093:+	9:35721172:-	lncrna,onkogen, kanser	muhtemelen yeni füzyon	TTAGAGTGGTAGGCAATGTTTACACTATTGACCTTATAT AGGGAAGGGA*TTATCATCAGAGTAAAAATAAGAGACTT CCTAAATGATATGTATTGAAA
BR2032D	BCL2	NSD2	18:63274450:-	4:1886348:+	onkogen,kanser, tümör	muhtemelen yeni füzyon	CAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCTGTCTCTACTAAAAA TACAAAAAAT*AGGTGTGCACCACTATGCCAGCTAATTT TTGTATTTTAAATAGAGACAG
	MRRF	NSD2	9:122305263:+	4:1886348:+	onkogen,kanser, tümör	muhtemelen yeni füzyon	CAGCCTGGCCAACATAGCGAAACCCATCTCTACTAAAAA TACAAAAAAT*AGGTGTGCACCACTATGCCAGCTAATTT TTGTATTTTAAATAGAGACAG
	CDK6	USP11	7:92755873:-	X:47236604:+	onkogen,kanser	muhtemelen yeni füzyon	GCAAGAAAGAGTGAAAGAGATACCCATGCATAGAATTTT TAAACCGGGCA*TCAAACACAAATCAGACACAAGAGAAA ACTAGAAGACAGAAAAATAAGAA
	DA750114	SFT2D2	9:106170399:+	1:168247725:+	resiprokal	muhtemelen yeni füzyon	CAAGGATCTAGAAGCAGAAATACCAATTGACCCAGCAAT CCCATTACTGG*TTCTAGATCCTTGAGGAATCGCCACACT GTCTTTCACAAATGGTTGAACCTA
	AC011346.1 (LncRNA)	TBC1D32	5:148329731:-	6:121270112:-	lncrna,resiprokal	muhtemelen yeni füzyon	TCCTGAATGACTACTGGGTACATAACAAAATGAAGGCAG AAATAAAGATG*TGCTTTGAATGTGCCAGAGATTCTGG TATGTTGTCTTTGTTCTCTGT
	FARSB	XACT	2:222589632:-	X:114021979:-	lncrna	muhtemelen yeni füzyon	TTGTTTGATTTTTCTTGTAATTTGTTAAGTTCTTTGTAG ATTCTGGA*TCAAACACCCCATCAAAAAGTGGGCAAG GATATGAACAGACACTTCTC
	PCYT1A	H6PD	3:196214235:-	1:9271203:+		muhtemelen yeni füzyon	TCGGCGCGCAGCTCTCACCTGGAATCCCAGCACTTTGG GAGGCCGAAGC*GGATTACAGGCGGGAGCCACCATGCCT GCCAGAACAAATGCCTTTTAA

5. TARTIŞMA

Over kanseri, jinekolojik kanser türleri arasında malignite ve mortalite oranı yüksek olan ve en sık görülen ikinci jinekolojik kanserdir. Geç tanı ve kemoterapiye direncin gelişmesi başarılı tedavinin önündeki en büyük engellerdir. Genomik ve transkriptomik çalışmalar, şu anda büyük ölçüde *p53* ve *BRCA1/2* ile sınırlandırılmış sınırlı sayıda öncü mutasyonu tanımlamayı başarsa da tedaviyi belirlemek için kullanılabilecek öngörücü kalıpları tanımlamak için genel olarak yetersizdir. Mevcut over kanseri biyobelirteçleri olan CA125 ve CA15-3, dokuda protein seviyesi çok yükseldikten sonra kanda tespit edilen markerlar oldukları için erken evre tümör markerı olarak kullanılamamaktadır. Bu markerlara alternatif daha erken evrede tümör tespiti yapan, tanıda, tedavide ve tedavi takibinde kullanılabilecek over kanserine özgü moleküllere ihtiyaç vardır.

Çalışmada *BRCA1* gen mutasyonu taşıyıcısı olan ancak sadece birinin over kanserine yakalandığı ve dolayısıyla fenotipik olarak diskordant monozygotik kardeşlerin ve diğer sağlıklı kardeşin over dokularına ve periferik kan örneklerine ait RNA örnekleri yeni nesil dizilime teknolojisi kullanılarak transkriptom sekanslama yöntemi ile genomda ifade edilen tüm RNA moleküllerinin miktarı ve çeşidi eş zamanlı olarak araştırılmış ve fenotipik farklılığa yol açan genetik değişiklikler değerlendirilerek bu değişikliklerin over kanserinin etiyolojisi, diyagnozu ve prognozundaki olası rolleri değerlendirilmiştir. Çalışmada ekspresyon değişim oranları (fold change-log2fc) over kanseri için oldukça bilinen ve yaygın kullanılan tümör markerları *MUC16/CA125* ve *MUC1/CA15-3*'ün ekspresyon seviyeleri baz alınarak filtrelenmiştir. Ekspresyon değişimi gösteren genler, 3 karşılaştırma grubunda değerlendirilmiştir.

Çalışmadaki Grup 1 karşılaştırmasında, *MUC16/CA125* ekspresyon seviyesine göre yapılan filtreleme baz alınarak yapılan incelemede over tümör dokusunda sağlıklı dokulara göre ekspresyonu değişen 101 gen, öncelikle mitokondriyal genler, snoRNA'lar, ADAMTS genleri olmak üzere 3 farklı grupta değerlendirilmiştir. Bu incelemede dikkat çeken ilk grup mitokondriyal genlerdir. Bilindiği üzere mitokondri, oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretimi, hücre ölümü, kalsiyum seviyeleri kontrolü, lipid homeostazı ve metabolik hücre sinyalleme dahil olmak üzere hücre içi operasyonda önemli roller üstlenen sitoplazmik organeldir. Mitokondriyal DNA'nın

(mtDNA) nükleer DNA'ya kıyasla değişikliklere daha duyarlı olduğu iyi bilinmektedir. Bu değişiklikler mitokondriyal disfonksiyona neden olabilir ve bu da DNA onarım kusurlarına bağlı hücreleregülasyonu açıklayarak kanser gibi farklı hastalıkların gelişmesine neden olabilir. Kanser ayırt edici özelliklerinin (hayatta kalmak ve çoğalmak için tümör tarafından kazanılan yetenekler) her ikisi de mitokondriyal işlevlerle doğrudan ilişkili olan enerji deregülasyonu ve hücre ölümünden kaçınma özellikleri olması dikkat çekmektedir. Aslında, birçok çalışmada, mtDNA instabilitesi ve heteroplazminin farklı kanser türleri ile bir ilişkili olduğu gösterilmiştir [106]. Çalışmamızda hastaya ait tümör dokusu örneğinin hem diğer sağlıklı over dokularıyla kıyaslanması hem de hastanın kendi periferik kan dokusu ile kıyaslanması sonucunda *MT-RNR1*, *MT-RNR2*, *MT-TV*, *MT-ND4L*, *MT-TY*, *MT-CO2*, *MT-TL1*, *MT-TM*, *MT-CO1*, *MT-TK*, *MT-TQ*, *MT-TD*, *MT-TR*, *MT-TM*, *MT-TI* mitokodriyal genleri başta olmak üzere birçok farklı gende yüksek düzeyde ekspresyon artışı gözlenmiştir. Ekspresyon artışı gösteren mitokondriyal genlerin bazılarında artan bu ekspresyon durumu, yapılan farklı çalışmalarda da ortaya konmuştur. Örneğin LaShanale Wallace ve ark. tarafından kolorektal kanserli vakalarla yapılan bir çalışmada, *MT-RNR1*, *MT-ND1*, *MT-CO1*, *MT-ATP6*, *MT-ND6*, ve *MT-CYB* olmak üzere altı mt geninin adenopoliplerin malign lezyonlara dönüşümünde yüksek ekspresyon gösterdiği saptanmış ve bu tümörlerde söz konusu mt genlerinin potansiyel olarak kritik öneme sahip olduklarını vurgulamışlardır [107]. Benzer bir çalışma Piotr Bragoszewski ve ark tarafından over kanser dokularında yapılmış ve aynı şekilde bu altı transkriptin içinde özellikle *MT-RNR1*'in ekspresyonunun, kemoterapiye karşı tümör duyarlılığının bir prediktörü olarak kullanılabileceğini ortaya çıkarmıştır [108].

Çalışmada tümördeki ekspresyon değişimi ile dikkat çeken diğer bir gen grubu, snoRNA genleridir. Küçük nükleolar RNA olan snoRNA'lar, ökaryotik hücrelerin nükleollerinde yaygın olarak bulunan küçük bir kodlamayan RNA türüdür. 0-300 nt uzunluğa ve korunmuş yapısal unsurlara sahiptirler. Fonksiyonu esas olarak ribozomal RNA'nın dioksimetilasyonunu ve yalancı urasilizasyonunu baz eşleşmesi yoluyla yönlendirmekle birlikte, snoRNA'nın snRNA, tRNA ve mRNA'nın posttranskripsiyonel modifikasyonunda rol oynadığına dair bulgular da mevcuttur [109]. Diğer başka kanıtlar, snoRNA'ların birçok tümörün karsinogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu kanıtlardan biri *SNORA42* aktivasyonunun, akciğer tümör oluşumunda onkogenik bir role sahip olabileceğini ve malignite için potansiyel tanıl

ve terapötik hedefler sağlayabileceğini belirtmişlerdir [110]. Başka bir çalışmada Cui ve ark. insan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) dokularında artan *SNORA23* ekspresyonunun, PDAC hücrelerinin hayatta kalmasını ve istilasını teşvik ettiğini belirtirken [111] ; Yoshida ve ark. *SNORA21*'in kolorektal kanserlerde prognostik bir biyobelirteç niteliği taşıyan anahtar bir onkojenik snoRNA olarak tanımlamışlardır [112]. Sekanslama teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, gittikçe daha fazla veri, snoRNA'nın anormal bir şekilde düzenlendiğini ve kanserlerde işlev gördüğünü göstermektedir. Bununla birlikte, over kanserinde snoRNA'ların fonksiyonel mekanizmaları ve klinik değerleri henüz yeterince anlaşılmamıştır. Çalışmamız ile ilk defa over tümör dokularında sağlıklı dokulara göre yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenen *SNORA63*, *SNORA26*, *SNORA21*, *SNORA21B*, *SNORA62*, *SNORA14A*, *SNORA71A* ve *SNORA74* genlerinin, over kanseri için önemli bir biyolojik belirteç olma potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir. Bu nedenle söz konusu genlerin gelecekte yapılacak olan büyük ölçekli çalışmalarda incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca *SNORA63*'ün over kanserli vakada sağlıklılara göre kanda düşük, dokuda yüksek ekspresyon göstermiş olması, bu genin tanı ve tedavi takibinde potansiyelinin olduğunu ve araştırılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmada ekspresyon değişimi gösteren gen gruplarından biri de ADAMTS genleridir. ADAMTS (Trombospondin motifli bir Disintegrin ve Metalloproteinaz) ailesi, doku morfogenez, inflamasyon, anjiyogenez ve kanser dahil olmak üzere çeşitli biyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynadığı bulunan 19 çinko metalloproteazı içerir. Bugüne kadar, 19 üyeden 10'unun kanser oluşumunda tümör baskılayıcı veya onkojen olarak dahil olduğu doğrulanmıştır. Aynı ADAMTS moleküllerinin farklı mikroçevrede tümörögenез üzerinde farklı etki gösterdiği bilinmektedir [113]. Son zamanlarda edinilen bilgilere dayanarak, *ADAMTS5*'in normal fizyolojik olayların yanı sıra kanser gibi patolojilerde de önemli roller oynadığı anlaşılmıştır. *ADAMTS5*'in aşağı regülasyonunun veya hipermetilasyonunun, fare melanomunda, insan hepatoselüler karsinomunda (HCC) ve insan kolorektal kanserinde tümör baskılayıcı fonksiyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Buna karşın insan glioblastomalarında *ADAMTS5*'in aşırı ekspresyonu bildirilmiştir ve hücre invazyonunu uyardığı belirtilmiştir. Bu nedenle, *ADAMTS5* muhtemelen farklı rollere sahiptir ve/veya çeşitli tümörlerde farklı moleküler mekanizmalarda yer aldığı görülmektedir [114]. Aihong Wang ve ark yaptığı çalışmada, *ADAMTS9-AS2* ekspresyonlarının over kanser dokularında ve hücre hatlarında düşük

olduğu gösterilmiştir [115]. Çalışmamızda da *ADAMTS5*, *ADAMTS4*, *ADAMTS1* ve *ADAMTS9-AS2* ekspresyonunun tümör dokusunda sağlıklı dokuya kıyasla 3 kattan fazla düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir. Over kanserli dokuda bu aileye ait 4 üyenin düşük ekspresyonu, epitelyal over kanseri prognozu ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda Grup 1’de yapılan karşılaştırmada, tümör dokusunda sağlıklı over dokusuna göre ekspresyonu yüksek olan genler *MUC16/CA125* ve *MUC1/CA15-3* seviyesinde ekspresyon gösteren diğer kodlayan genler olarak ayrı bir grupta incelenmiştir. Bu gruptaki genlerden sırasıyla bahsedecek olursak; ilki *WFDC2*, diğer adıyla *İnsan Epididim Proteini 4 (HE4)*, over malign tümörlerinde yüksek ekspresyon seviyesi ile teşhiste değerlendirilen bir biyobelirteçtir. Çeşitli algoritmalarda, farklı eşik değerleri ile *HE4* ve *CA125* seviyelerinin kombinasyonunun değerlendirilmesi, malign kitlenin benign lezyonlardan ayrılmasında ve tedavi takibinde önemli olacağı bildirilmiştir [116]. Gruptaki genlerden bir diğeri olan *SLC34A2*, tip II Na/Pi ortak taşıyıcı olan NaPi2b’yi kodlayan çözünen taşıyıcı gen ailesinin bir üyesidir. NaPi2b, transselüler inorganik fosfat absorpsiyonundan, fosfat homeostazının sürdürülmesinden ve tümörögenezden sorumlu olan çoklu transmembran sodyum-bağımlı bir fosfat taşıyıcısıdır. Over kanserinde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, *SLC34A2*’nin artmış ekspresyonu bildirilmiştir [117]. Meme kanseri çalışmalarında, yüksek *SLC34A2* ekspresyonu, büyük tümör boyutu, ilerlemiş T durumu ve kısa sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir. *SLC34A2* baskılanmış glioma çalışmasında, tümörün EMT durumunun da baskılandığı ortaya çıkarılmış [118]; meme kanseri kanser kök hücrelerinde yapılan çalışma ile de tümör hücrelerinin küçük bir kısmının, tümörüjenik potansiyeli harekete geçiren kendi kendini yenileme kapasitesinin korunmasına da katkı sağladığı belirtilmiştir [117]. Çalışmamızda sağlıklı over dokusuna göre tümör dokusunda ekspresyonu yüksek olan bir diğer gen *MAL2*’dir. Çok sayıda kanser türünde, gen kopya sayısındaki artışlarla bağlantılı olarak *MAL2* aşırı ekspresyonuna ilişkin sık raporlar, aşırı *MAL2* ekspresyonunun bir epifenomen olduğunu savunmakla birlikte, meme kanserindeki bir çalışma ile *MAL2*’nin *MUC1* onkoproteinine bağlandığı da gösterilmiştir [119]. Jennifer A. Byrne ve ark tarafından yapılan bir çalışmada over karsinomunda, özellikle seröz tümörlerde *MAL2* aşırı ekspresyonu vurgulanmış, over karsinomlarında sık sık aşırı ekspresyonu, iyi huylu ve sınır lezyonlarda düşük ekspresyonu ile birlikte, *MAL2*’nin hastalığın saptanmasına ve/veya izlenmesine yardımcı olmak için yararlı bir işaret bileşeni olabileceği belirtilmiştir [120]. Bu

gruptaki genlerden bir diğeri olan *SLPI* hem over hem de meme kanserinde upregüle olan bir serin proteaz inhibitör proteindir. *SLPI*, kısmen *MMP-9* salınımını zayıflatan serin proteaz inhibitör aktivitesi ile over kanseri invazyonunu modüle eder. Bununla birlikte, *MMP-9*'un, proteaz inhibisyon aktivitesinden bağımsız olarak *SLPI* indüksiyonu, pro-invazif davranış geliştirecek kadar net ve büyüktür. Bu bulgular ayrıca *SLPI*'yi over kanseri için moleküler bir hedef olarak desteklemektedir [121]. *SLPI*'nin ayrıca ERK yolağı ile paklitaksel ilacına direnç sağlamada da etkili olduğu bildirilmiştir [122]. Bu gruptaki genlerden *ACTA1* geni, hücre hareketliliği, yapısı ve bütünlüğünde rol oynayan yüksek oranda korunmuş proteinler olan aktin protein ailesine ait bir protein kodlar. *ACTA1* geninin oral epitel displazisinde ve baş ve boyun yassı hücreli karsinomda (HNSCC) anormal şekilde ifade edildiği ve HNSCC hastalarının agresifliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [123]. Literatürde *ACTA1*'in over kanserindeki durumu ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Reaktif oksijen türlerini (ROS) ve diğer zararlı oksidasyon ürünlerini temizleyerek hücreleri koruduğu için alternatif olarak hücrel stres tepkisi (CSR) geni olarak adlandırılan *SCARA3*'ün, oksidatif stres ile ekspresyonunun indüklendiği bildirilmiştir [124]. Ayrıca meme kanseri ile karşılaştırıldığında over kanserinde/primer peritoneal karsinomlarda aşırı eksprese edildiği belirtilmiştir[125]. Sıkı bağlantı proteini ve hücre polaritesinin, hücrel düzenlemenin, adezyonun, parasellüler taşınmanın ve çeşitli epitellerin iyonik geçirgenliğinin korunmasında önemli roller oynayan *Claudin 16 (CLDN16)* geninin, meme kanser dokularında komşu normal dokulara kıyasla yüksek düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir [126]. *COX6B1* ekspresyonunun polikistik over sendromlu vakalardan elde edilen oosit hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre yüksek olduğu bildirilmiştir [127]. Ancak bu gen ile ilgili over kanserinde yapılmış bir çalışma literatürde yer almamaktadır.

Çalışmamızda bu grup 1 karşılaştırmasındaki genler arasında hastanın tümör dokusunun monozigotik ikizinin sağlıklı over dokusuyla birebir karşılaştırmasıyla da öne çıkan *CP*, *MAL2*, *CDH6*, *PODXL*, *SCNN1A*, *SLC2A1*, *EHF*, *CD24*, *BTLA*, *CCND1*, *CLU* ve *PGRMC1* genlerinin tümördeki yüksek ekspresyon seviyeleri oldukça dikkat çekicidir. Bu genlere bakıldığında *CP*, *MAL2*, *PODXL*, *SCNN1A*, *SLC2A1* ve *CLU*'nun *CA125* ve *CA153* gibi hücrenin ekstrasellüler bölgesinde rol oynadığı GO analizi ile de ortaya çıkarılmıştır (bknz Tablo 4-18). Tarafımızca tespit edilen bu bulgu over kanseri için biyomarker potansiyeli taşıdığından over kanserine spesifik bu

durumun gelecekte büyük örneklemelerde çalışılarak biyomarker potansiyelinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Buradaki diğer genlerden biri olan ve hücre-hücre adezyon moleküllerinden biri olan *CDH6* (Kaderin 6)'nın integrinler ile birlikte kanser invazyonunun ve metastazının düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir. Son çalışmalar, *CDH6*'nın otofajiyi kısıtlayarak EMT'yi ve metastazı desteklediğini göstermektedir [128] [129]. Bu bulgular *CDH6*'nın gastrointestinal tümörler, jinekolojik tümörler ve melanoma gibi kanserlerde terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir. Tümördeki yüksek ekspresyon seviyesi ile öne çıkan bir diğer gen *EHF* genidir. Literatürde hem over dokusunda sağlıklı dokular ile kıyaslanarak yapılan ekspresyon çalışmaları hem de yine over kanser hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar, *EHF* yüksek ekspresyonunun, seröz over kanserinde zayıf sağkalım ile ilişkili olduğunu [130] göstermektedir. Bundan başka, *EHF*'nin over karsinomunun malign mezotelyomadan ayırıcı tanısında da kullanılabileceği prognostik bir belirteç potansiyelinin olduğu vurgulanmaktadır [131]. Çalışmamızda tümörde yüksek ekspresyon gösteren *CD24* geninin, yapılan GO analizinde hücrenin plazma zarında bulunduğu ve hücrel farklılaşma gibi hücrel süreçlerde rol oynayan bir protein kodladığı gösterilmiştir. Literatüre göre, *CD24* geninin içinde over kanserinin de olduğu bir çok tümör dokusunda yüksek ekspresyon olduğu bilinmektedir. Ayrıca son çalışmalar söz konusu molekülün over kanserinde terapötik hedef potansiyeli olduğunu da vurgulamaktadır [132]. *BTLA* geninin ise over tümör hücrelerinde komşu sağlıklı dokulara kıyasla yüksek ekspresyon gösterdiği ve son çalışmalarda da yüksek miR32 ile *BTLA*'nın baskılanması sonucunda over kanseri hücrelerinin proliferasyonunun ve metastazının inhibe edildiği bildirilmiştir [133]. Over hücreleri tarafından ekspresyon edilen *progesteron reseptör membran bileşeni-1 (PGRMC1)*, over tümör hücrelerinde de yüksek ekspresyon gösterdiği, hücrelerin hayatta kalmasını destekleyen, apoptozu engelleyen süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir [134]. Buna ek olarak bu gendeki yüksek ekspresyonun, over tümörlerinde kemodirenç ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir [135].

Çalışmamızda dokuda düşük ekspresyon gösteren genler arasında (Grup 1 karşılaştırması), yine hastanın tümör dokusunun monozigotik ikizinin sağlıklı over dokusuyla bire bir karşılaştırmasında da *EIF1B*, *MAP3K5*, *FIBIN*, *GSTA4*, *POLR3GL*, *PDGFD* ve *ITCH* düşük ekspresyon seviyeleri ile dikkat çekmektedir. Yapılan GO analizine göre bu genlerin oksidatif strese karşı geliştirilen hücrel yanıtta, hücre

ölümünün pozitif düzenlenmesinde, apoptotik süreçlerde, reaktif oksijen türlerine tepkide, hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde, lökosit hücre göçünde, hücre çoğalmasının negatif düzenlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir (Bknz Tablo 4-19). Bu genlerden *GSTA4*'ün over adenokarsinom hücre hatlarında sispaltine dirençte yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiği bildirilmiştir [136].

Çalışmadaki Grup 2 karşılaştırması sonucunda, hastanın kan örneğinde diğer sağıklara ait kan örneklerine kıyasla yüksek ekspresyon gösteren genler arasında, ikizi ile birebir karşılaştırmada da öne çıkan *CXCL8*, *EGR1*, *NR4A2*, *JUN*, *NAMPT*, *DUSP2* ve *RGS1* yüksek ekspresyon seviyeleri ile dikkat çekmektedir. Burada yüksek ekspresyon gösteren bu genler GO ve KEGG analizleri ile de gösterildiğı gibi NF-kappa B sinyal yolağı, TNF sinyal yolağı, IL-17 sinyal yolağı olmak üzere birçok sinyal yolağında rol oynamaktadır (bknz Tablo 4-21). Ayrıca *NR4A2*'nin kanda yüksek tümör dokusunda düşük ekspresyon gösterdiği gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında, genel olarak *NR4A*'ların (nükleer reseptör 4A) , *TGFβ3* ve *SMAD3* dahil olmak üzere profibrotik faktörlerin ifadelerini ve hücre dışı matrisin anahtar bileşenleri olan birkaç kolajeni düzenlediğı [137]; *NR4A2*'nin glioblastomlarda pro-onkojenik olduğu ve dolayısıyla bu reseptörü eksprese eden tümörlere sahip hastalar için potansiyel terapötik hedef olabileceğı bildirilmiştir [138]. Over kanserli vakanın kanında yüksek, dokuda düşük ekspresyon gösterdiği tespit edilen fosfataz *DUSP2/PAC1*'in, seröz over kanserinde *MAPK*'nın negatif düzenleyicisi olduğunun belirlenmesi [139], çalışmamızdaki düşük *MAPK* ekspresyonunun nedenini göstermektedir. Yüksek ekspresyon gösteren bir diğer gen *NAMPT* genidir. *NAD+* üretimini arttırarak kanser kök hücrelerinin artışına neden olan bu genin inhibisyonunun EOC'da platin bazlı KT ile indüklenen CSC'lerin baskılanmasına neden olmaktadır [140]; ayrıca bu genin *BRCA1* fonksiyonunun olmadığı over kanseri hücre hatlarında yüksek ekspresyona sahip olduğu gösterilmiştir [141]. Tüm bu bilgilerin, bizim sonuçlarımızla da uyumlu olduğu görülmektedir.

Kandaki düşük ekspresyon durumu ile *C1orf74* ve *U3/SNORD3A* genleri bu grup içinde dikkat çekmekte olup literatürde kanserdeki rolü ile ilgili az bilgi bulunmaktadır. Bu bulgular eşliğinde kan glikoz metabolizmasında rol oynadığı bilinen *C1orf74*'ün over kanserindeki önemi gelecekte geniş over kanser kohortlarında araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Buradaki bir diğer gen olan *U3/SNORD3A* bir

snoRNA'dır ve birkaç çalışmada ilişki içinde olduğu diğer moleküller ile birlikte kanserde ilaç direncinin gelişmesinde rol oynadığı gösterilmiştir [142] [143].

lncRNA'ların, kanserin gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayan yeni bir oyuncu sınıfı olduğunu gösteren çok sayıda araştırma, kanserlerde bu transkriptlerin sıklıkla anormal bir şekilde ifade edildiğini ve bazılarının nöroblastoma, prostat, meme, over, mide ve kolorektal kanser ve multipl miyelomda tanı ve prognozla ilişkilendirildiğini göstermektedir [144]. Kanserde spesifik ekspresyonu nedeniyle lncRNA'lar, kanseri teşhis etmek veya hastanın yaşam süresini tahmin etmek amacıyla kullanılabilecek moleküller haline gelebilir. Bu nedenle, over kanserinde spesifik olarak eksprese edilen çeşitli lncRNA'ların tanımlanması, over kanseri hastaları için tahmin edici ve prognostik değere sahip olabilir. Çalışmamızda tüm gruplarda tespit edilen lncRNA'ların hastalık ile ilişkisi lncdatabase üzerinden tespit edilmiş ve bu veri tabanına göre henüz over kanseri ile ilişkisi araştırılmamış olan ve Ensembl, NCBI-Gene veri tabanlarında yeni transkript (novel) olarak yer alan dokuda 17, kanda 8 tane lncRNA tarafımızca saptanmıştır. Dokuda tespit edilen bu 17 novel lncRNA'nın 2 tanesinin tümörde yüksek ekspresyon gösterdiği; 15 tanesinin ise düşük ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Hastanın periferik kanında tespit edilen 8 novel lncRNA'nın ise 3 tanesinin yüksek ekspresyon gösterdiği; 5 tanesinin düşük ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Burada, ilk defa bu çalışma ile ortaya konan toplam 25 novel lncRNA ile lncdatabase'e göre henüz over kanseri ile ilişkisi bilinmeyen toplam 34 lncRNA dikkat çekmektedir. Kanserdeki önemi düşünüldüğünde bu moleküllerin epitelyal over kanserinde marker moleküller olabileceği, hedef moleküllerinin ve hastalık ile ilişkili potansiyellerinin büyük örneklemelerde araştırılması gerektiği ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda 3 karşılaştırma sonucunda, dokuda ve kanda önemli seviyede ekspresyon değişikliği gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Bilindiği üzere miRNA'lar mRNA'ları hedef alarak gen ekspresyonunu düzenleyebilen 19-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan düzenleyici RNA'lardır. Bu RNA'ların baz sayısı olarak, oluşturulan cDNA kütüphanesinin altında kalacağı düşünüldüğünde tespit edilen miRNA ların mature miRNA olmadığı 'stem-loop' olarak adlandırılan öncül transkript üzerinden tespitlerin yapıldığı düşünülmüş, mirbase database üzerinden de kontrol edilerek doğrulanmıştır. Bu şekilde 9 öncül miRNA(pri-miRNA) tespit edilmiş, bunların içinde anlamlı seviyede ($\log_2fc > 2$ ve $p < 0.05$) *MIR1206* ve *MIR4256*'nın

tümör dokusunda sağlıklı dokulara kıyasla yüksek ekspresyon gösterdiği; *MIR611*, *MIR3648-1*, *MIR3648-2* ve *MIR4761*'in düşük ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Hastanın periferik kan dokusunda ise sağlıklı kan örneklerine kıyasla *MIR616* ve *MIR6821*'in ekspresyonunun arttığı; *MIR4718*'in ise düşük ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu miRNA'lara sırası ile bakacak olursak: miR1206'nın mirBase'e göre belirlenmiş olan hedef genleri arasında *BRCA1* yolağında da yer alan *BARD1*, *NBR1*, *BRCC3*, *RAD51*, *RBBP8* ve *NBN* genleri bulunmaktadır. Ayrıca *MIR4256* da aynı şekilde dokuda yüksek ekspresyon göstermektedir ve hedef genleri arasında yine *BRCA1* yolağında yer alan *RAD51* ve *MRE11A* bulunmaktadır. Hastalık patogenezinde mevcut *BRCA1* disfonksiyonuna ek olarak hastada DNA tamir genlerinden olan bu genlerin de mRNA'larının bu miRNA'lar aracılığıyla baskılanması, over kanseri açısından diskordant olan bu aile bireylerindeki fenotipik farklılığın altında yatan nedenler arasında yer alabileceğini düşündürmektedir.

Hastanın kanında sağlıklılara göre ekspresyon artışı gösteren *MIR616*'nın yakın zamanda kanser ilişkili miRNA olarak tanımlanmasının [145] ardından over kanserinde yapılan çalışmalarda over kanserli dokularda miR616'nın yüksek ekspresyon düzeyinin, EMT, invazyon ve metastazda önemli rol oynadığını göstermiştir [146]. Çalışmamızda da yakın bölge metastazına sahip hastamızın kanındaki yüksek ekspresyon seviyeleri hastalık ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca kanda yüksek düzeyde bulunmasının hastalığın takibinde de kullanılabilecek prognostik bir marker olma olasılığını akla getirmektedir. Kandaki yüksek ekspresyon seviyesi ile dikkat çeken bir diğer miRNA olan *MIR6821* daha önce Alzhemier hastalığının beyin üzerindeki etkisi ile literatürde yer almış [147], kanserle ilişkili olarak ilk defa bizim çalışmamızla over kanseri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Over kanser vakasına ait periferik kanda yüksek düzeyde tespit edilen *MIR6821*'in over kanseri için erken tanı ve hastalığın prognozunda kullanılabilecek bir biyolojik belirteç olma potansiyeli gelecekte overin benign hastalıklarını da kapsayan büyük çalışma gruplarında araştırılmalıdır.

Tümör dokusunda düşük ekspresyon değeri ile dikkat çeken *MIR4761*'in hedef genlerine bakıldığında [148], *BRCA1* ilişkili gen olan *BRAP*'ın olduğu görülmüştür. Literatürde henüz bu miRNA ile ilişkili bir çalışma bulunmamakla birlikte, ilk defa bizim çalışmamız ile over kanser dokusundaki düşük ekspresyon durumu ortaya çıkarılmıştır. Bu miRNA'nın *BRCA1* ile ilişkili durumundan dolayı over kanseri

patogenezindeki rolünün hedef genleri üzerinden araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda over kanserli hastaya ait kan örneğinde sağlıklılara göre önemli seviyede düşük ekspresyon gösteren MIR4718'in, hepatit-C enfeksiyonu sonrasında gelişen hepatosellüler karsinomda da düşük ekspresyon gösterdiği, bu durumun da tekrarlayan kanserde hücre proliferasyonunda ve apoptozdan kaçışta etkili olduğu bildirilmiştir. Bu miRNA'nın over kanserindeki durumu ilk defa bu çalışma ile gösterilmiştir. Bu molekülün de over kanserinin erken tanısında kullanılabilecek bir molekül olup olmadığının gelecek çalışmalarda araştırılması gerekmektedir.

Prostat kanser dokularında yüksek MIR3648-1 ekspresyonunun bir tümör süpresör gen olan APC2'yi baskıladığı; dil sküamoz hücreli karsinomda yapılan başka bir çalışmada da yüksek MIR611 ekspresyonunun FOXN3'ü baskılayarak invazyon ve metastaza neden olduğu bildirilmiştir [149]. Çalışmamızda bu miRNA'ların hastada, sağlıklı doku ve kan örneklerine göre yüksek düzeyde farklılık göstermiş olması, öneminin büyük hasta gruplarında çalışılarak ortaya çıkarılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda füzyon gen analizi de yapılmış olup buradan elde edilen sonuçlar Tablo 4-22'de verilmiştir. Burada her bir örneğe ait transkriptler, birkaç farklı füzyon analiz programında analiz edilmiş ve son olarak Fusioncatcher [105] programındaki analiz sonuçlarına göre, örneklerde lncRNA füzyonlarının oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen tüm füzyonlar, literatürde daha önce yer almayan ve program tarafından da “muhtemel yeni füzyon” olarak değerlendirilmiş olan füzyonlardır. Bu sonuçlara göre, her örnekte kendine özgü füzyonlar bulunduğu, over dokusunda tespit edilen 2 füzyonun (AC084782.1(lncRNA)-NEAT1 (lncRNA) ve HDAC7- SLC48A1) over kanseri etiyolojisi ve tanısında önemli olabileceği ve bu nedenle ileri ki çalışmalarla araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Özetle, *BRCA1* mutasyonu ilişkili epitelyal over kanseri patogenezinin, doğada birbirine en yakın organizma olan monozigotik ikizler ile ikiz olmayan kardeşinin ele alınarak incelendiği bu çalışmada, yeni nesil dizileme sistemi olan BGI-Seq500 platformunda, tüm genomda eksprese olan moleküller incelenmiş ve bu moleküllerin veri tabanlarındaki araştırması sonucunda bir kısmının literatürde de yer aldığı bir kısmının ise bu çalışma ile ilk defa ortaya konduğu gösterilmiştir. Yapılan inceleme

sonucunda 3 farklı grupta ekspresyon değişimi gösteren 66 protein kodlayan gen, 25 novel lncRNA, 9 miRNA ve 2 füzyon transkriptin ekspresyon seviyelerindeki farklılık, over kanseri ile ilişkili aday moleküller olarak belirlenmiş ve prognostik, terapotik ve tedavi takibindeki potansiyellerinin büyük hasta gruplarında çalışılarak ortaya çıkarılması gerektiği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Han, C.Y., et al., *Tumor metabolism regulating chemosensitivity in ovarian cancer*. Genes Cancer, 2018. **9**(5-6): p. 155-175.
3. Gagnon, A. and B. Ye, *Discovery and application of protein biomarkers for ovarian cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008. **20**(1): p. 9-13.
4. Ayen, A., et al., *Recent Progress in Gene Therapy for Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(7).
5. Erdogan, O.S., et al., *Genome-wide methylation profiles in monozygotic twins with discordance for ovarian carcinoma*. Oncol Lett, 2020. **20**(6): p. 357.
6. Tuncer, S.B., et al., *miRNA expression profile changes in the peripheral blood of monozygotic discordant twins for epithelial ovarian carcinoma: potential new biomarkers for early diagnosis and prognosis of ovarian carcinoma*. J Ovarian Res, 2020. **13**(1): p. 99.
7. Gee, M.E., et al., *DNA damage repair in ovarian cancer: unlocking the heterogeneity*. J Ovarian Res, 2018. **11**(1): p. 50.
8. Ko, S.Y. and H. Naora, *Therapeutic strategies for targeting the ovarian tumor stroma*. World J Clin Cases, 2014. **2**(6): p. 194-200.
9. Pchejetski, D., et al., *Histone deacetylases as new therapy targets for platinum-resistant epithelial ovarian cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2016. **142**(8): p. 1659-71.
10. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
11. Visintin, I., et al., *Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 1065-72.
12. Jordan, S., et al., *Patterns of chemotherapy treatment for women with invasive epithelial ovarian cancer--a population-based study*. Gynecol Oncol, 2013. **129**(2): p. 310-7.
13. Yang, Q., et al., *Epigenetics in ovarian cancer: premise, properties, and perspectives*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 109.
14. Cancer Genome Atlas Research, N., *Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 609-15.
15. Ahmed, A.A., et al., *Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary*. J Pathol, 2010. **221**(1): p. 49-56.
16. Patch, A.M., et al., *Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer*. Nature, 2015. **521**(7553): p. 489-94.
17. Vang, R., et al., *Molecular Alterations of TP53 are a Defining Feature of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma: A Rereview of Cases Lacking TP53 Mutations in The Cancer Genome Atlas Ovarian Study*. Int J Gynecol Pathol, 2016. **35**(1): p. 48-55.
18. Lee, Y., et al., *A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube*. J Pathol, 2007. **211**(1): p. 26-35.
19. Iwanicki, M.P., et al., *Mutant p53 regulates ovarian cancer transformed phenotypes through autocrine matrix deposition*. JCI Insight, 2016. **1**(10).

20. Candeias, M.M., M. Hagiwara, and M. Matsuda, *Cancer-specific mutations in p53 induce the translation of Delta160p53 promoting tumorigenesis*. EMBO Rep, 2016. **17**(11): p. 1542-1551.
21. Kroeger, P.T., Jr. and R. Drapkin, *Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2017. **29**(1): p. 26-34.
22. Mukhopadhyay, A., et al., *Development of a functional assay for homologous recombination status in primary cultures of epithelial ovarian tumor and correlation with sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(8): p. 2344-51.
23. Alsop, K., et al., *BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2654-63.
24. Walsh, T., et al., *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18032-7.
25. Norquist, B.M., et al., *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma*. JAMA Oncol, 2016. **2**(4): p. 482-90.
26. Matulonis, U.A., et al., *Ovarian cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16061.
27. Konstantinopoulos, P.A., et al., *Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(22): p. 3555-61.
28. Burger, R.A., et al., *Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer*. N Engl J Med, 2011. **365**(26): p. 2473-83.
29. Aghajanian, C., et al., *OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(17): p. 2039-45.
30. Kaufman, B., et al., *Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation*. J Clin Oncol, 2015. **33**(3): p. 244-50.
31. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(15): p. 1382-92.
32. Bryant, H.E., et al., *Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 913-7.
33. Stover, E.H., et al., *Biomarkers of Response and Resistance to DNA Repair Targeted Therapies*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(23): p. 5651-5660.
34. Helleday, T., *The underlying mechanism for the PARP and BRCA synthetic lethality: clearing up the misunderstandings*. Mol Oncol, 2011. **5**(4): p. 387-93.
35. Ledermann, J., et al., *Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(8): p. 852-61.
36. Mirza, M.R., et al., *Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(22): p. 2154-2164.
37. Miller, R.E. and J.A. Ledermann, *The status of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in ovarian cancer, part 1: olaparib*. Clin Adv Hematol Oncol, 2016. **14**(8): p. 619-27.

38. OncoKB. 2021 02.19.2021]; Available from:
<https://www.oncokb.org/gene/BRCA1/Oncogenic%20Mutations/Ovarian%20Cancer>.
39. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines. 2021.
40. Konecny, G.E. and R.S. Kristeleit, *PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions*. Br J Cancer, 2016. **115**(10): p. 1157-1173.
41. Miller, R.E. and J.A. Ledermann, *The status of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in ovarian cancer, part 2: extending the scope beyond olaparib and BRCA1/2 mutations*. Clin Adv Hematol Oncol, 2016. **14**(9): p. 704-11.
42. Landen, C.N., Jr., M.J. Birrer, and A.K. Sood, *Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(6): p. 995-1005.
43. Vaughan, S., et al., *Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(10): p. 719-25.
44. Claus Risk Assessment Model. 2021.
45. Gail Model for Breast Cancer Risk. 2021.
46. Yazici, H., et al., *New Approach for Risk Estimation Algorithms of BRCA1/2 Negativeness Detection with Modelling Supervised Machine Learning Techniques*. Dis Markers, 2020. **2020**: p. 8594090.
47. Bartosch, C., B. Clarke, and T. Bosse, *Gynaecological neoplasms in common familial syndromes (Lynch and HBOC)*. Pathology, 2018. **50**(2): p. 222-237.
48. Etemadmoghadam, D., et al., *Amplicon-dependent CCNE1 expression is critical for clonogenic survival after cisplatin treatment and is correlated with 20q11 gain in ovarian cancer*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15498.
49. Karst, A.M., et al., *Cyclin E1 deregulation occurs early in secretory cell transformation to promote formation of fallopian tube-derived high-grade serous ovarian cancers*. Cancer Res, 2014. **74**(4): p. 1141-52.
50. Kuhn, E., et al., *CCNE1 amplification and centrosome number abnormality in serous tubal intraepithelial carcinoma: further evidence supporting its role as a precursor of ovarian high-grade serous carcinoma*. Mod Pathol, 2016. **29**(10): p. 1254-61.
51. Etemadmoghadam, D., et al., *Integrated genome-wide DNA copy number and expression analysis identifies distinct mechanisms of primary chemoresistance in ovarian carcinomas*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(4): p. 1417-27.
52. Nakayama, N., et al., *Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer*. Cancer, 2010. **116**(11): p. 2621-34.
53. Kim, J., et al., *Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer*. Cancers (Basel), 2018. **10**(11).
54. Karst, A.M. and R. Drapkin, *Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 932371.
55. Asadollahi, R., C.A. Hyde, and X.Y. Zhong, *Epigenetics of ovarian cancer: from the lab to the clinic*. Gynecol Oncol, 2010. **118**(1): p. 81-7.
56. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
57. Kukurba, K.R. and S.B. Montgomery, *RNA Sequencing and Analysis*. Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(11): p. 951-69.

58. Panoutsopoulou, K., M. Avgeris, and A. Scorilas, *miRNA and long non-coding RNA: molecular function and clinical value in breast and ovarian cancers*. Expert Rev Mol Diagn, 2018. **18**(11): p. 963-979.
59. Zhan, L., J. Li, and B. Wei, *Long non-coding RNAs in ovarian cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2018. **37**(1): p. 120.
60. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 223-7.
61. Clark, M.B., et al., *Quantitative gene profiling of long noncoding RNAs with targeted RNA sequencing*. Nat Methods, 2015. **12**(4): p. 339-42.
62. Rupaimoole, R. and F.J. Slack, *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2017. **16**(3): p. 203-222.
63. Jones, B.C., et al., *A somatic piRNA pathway in the Drosophila fat body ensures metabolic homeostasis and normal lifespan*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13856.
64. Sullenger, B.A. and S. Nair, *From the RNA world to the clinic*. Science, 2016. **352**(6292): p. 1417-20.
65. Hezroni, H., et al., *Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species*. Cell Rep, 2015. **11**(7): p. 1110-22.
66. Hung, T. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms*. RNA Biol, 2010. **7**(5): p. 582-5.
67. Flynn, R.A. and H.Y. Chang, *Long noncoding RNAs in cell-fate programming and reprogramming*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(6): p. 752-61.
68. Quinn, J.J. and H.Y. Chang, *Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(1): p. 47-62.
69. Dechamethakun, S. and M. Muramatsu, *Long noncoding RNA variations in cardiometabolic diseases*. J Hum Genet, 2017. **62**(1): p. 97-104.
70. Uchida, S. and S. Dimmeler, *Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases*. Circ Res, 2015. **116**(4): p. 737-50.
71. Kiss, T. and W. Filipowicz, *Exonucleolytic processing of small nucleolar RNAs from pre-mRNA introns*. Genes Dev, 1995. **9**(11): p. 1411-24.
72. Guttman, M., et al., *lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation*. Nature, 2011. **477**(7364): p. 295-300.
73. Schmitt, A.M. and H.Y. Chang, *Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways*. Cancer Cell, 2016. **29**(4): p. 452-463.
74. Wang, K.C. and H.Y. Chang, *Molecular mechanisms of long noncoding RNAs*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 904-14.
75. Fan, J., et al., *Long non-coding RNA ROR decoys gene-specific histone methylation to promote tumorigenesis*. Genome Biol, 2015. **16**: p. 139.
76. Schmitt, A.M., et al., *An inducible long noncoding RNA amplifies DNA damage signaling*. Nat Genet, 2016. **48**(11): p. 1370-1376.
77. Hata, A. and R. Kashima, *Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2016. **51**(3): p. 121-34.
78. Meister, G., *Argonaute proteins: functional insights and emerging roles*. Nat Rev Genet, 2013. **14**(7): p. 447-59.
79. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.

80. Siomi, H. and M.C. Siomi, *Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals*. Mol Cell, 2010. **38**(3): p. 323-32.
81. Yang, J.S. and E.C. Lai, *Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants*. Mol Cell, 2011. **43**(6): p. 892-903.
82. Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp, *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(6): p. 457-67.
83. Nelson, P., et al., *The microRNA world: small is mighty*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(10): p. 534-40.
84. Ross, J.S., J.A. Carlson, and G. Brock, *miRNA: the new gene silencer*. Am J Clin Pathol, 2007. **128**(5): p. 830-6.
85. Liu, Y., et al., *The emerging role of the piRNA/piwi complex in cancer*. Mol Cancer, 2019. **18**(1): p. 123.
86. Han, B.W. and P.D. Zamore, *piRNAs*. Curr Biol, 2014. **24**(16): p. R730-3.
87. Nishimasu, H., et al., *Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis*. Nature, 2012. **491**(7423): p. 284-7.
88. Iwasaki, Y.W., M.C. Siomi, and H. Siomi, *PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 405-33.
89. Singh, G., et al., *Genome-wide profiling of the PIWI-interacting RNA-mRNA regulatory networks in epithelial ovarian cancers*. PLoS One, 2018. **13**(1): p. e0190485.
90. Wang, J., et al., *RNA sequencing (RNA-Seq) and its application in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2019. **152**(1): p. 194-201.
91. Shur, N., *The genetics of twinning: from splitting eggs to breaking paradigms*. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2009. **151C**(2): p. 105-9.
92. Castillo-Fernandez, J.E., T.D. Spector, and J.T. Bell, *Epigenetics of discordant monozygotic twins: implications for disease*. Genome Med, 2014. **6**(7): p. 60.
93. Lyu, G., et al., *Genome and epigenome analysis of monozygotic twins discordant for congenital heart disease*. BMC Genomics, 2018. **19**(1): p. 428.
94. Lasa, A., et al., *Copy number variations are not modifiers of phenotypic expression in a pair of identical twins carrying a BRCA1 mutation*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **123**(3): p. 901-5.
95. Hladikova, A., P. Plevova, and E. Machackova, *[Breast cancer in monozygotic twins]*. Klin Onkol, 2013. **26**(3): p. 213-7.
96. Shen, W., et al., *SeqKit: A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0163962.
97. Kim, D., et al., *Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype*. Nat Biotechnol, 2019. **37**(8): p. 907-915.
98. Li, H., et al., *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, 2009. **25**(16): p. 2078-9.
99. Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov, *Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration*. Brief Bioinform, 2013. **14**(2): p. 178-92.
100. Pertea, M., et al., *StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(3): p. 290-5.
101. Frazee, A.C., et al., *Ballgown bridges the gap between transcriptome assembly and expression analysis*. Nat Biotechnol, 2015. **33**(3): p. 243-6.

102. Bao, Z., et al., *LncRNADisease 2.0: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D1034-D1037.
103. Ge, S.X., D. Jung, and R. Yao, *ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants*. Bioinformatics, 2020. **36**(8): p. 2628-2629.
104. The, R.C., *RNAcentral: a hub of information for non-coding RNA sequences*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D1250-D1251.
105. Nicorici, D., et al., *FusionCatcher – a tool for finding somatic fusion genes in paired-end RNA-sequencing data*. bioRxiv, 2014: p. 011650.
106. Cavalcante, G.C., et al., *Whole mitochondrial genome sequencing highlights mitochondrial impact in gastric cancer*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 15716.
107. Wallace, L., et al., *Expression of mitochondrial genes MT-ND1, MT-ND6, MT-CYB, MT-COI, MT-ATP6, and 12S/MT-RNR1 in colorectal adenopolyps*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 12465-12475.
108. Bragoszewski, P., et al., *Limited clinical relevance of mitochondrial DNA mutation and gene expression analyses in ovarian cancer*. BMC Cancer, 2008. **8**: p. 292.
109. Liu, J., et al., *Identification of potential prognostic small nucleolar RNA biomarkers for predicting overall survival in patients with sarcoma*. Cancer Med, 2020. **9**(19): p. 7018-7033.
110. Mei, Y.P., et al., *Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis*. Oncogene, 2012. **31**(22): p. 2794-804.
111. Cui, L., et al., *Small Nucleolar Noncoding RNA SNORA23, Up-Regulated in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Regulates Expression of Spectrin Repeat-Containing Nuclear Envelope 2 to Promote Growth and Metastasis of Xenograft Tumors in Mice*. Gastroenterology, 2017. **153**(1): p. 292-306 e2.
112. Yoshida, K., et al., *SNORA21 - An Oncogenic Small Nucleolar RNA, with a Prognostic Biomarker Potential in Human Colorectal Cancer*. EBioMedicine, 2017. **22**: p. 68-77.
113. Kumar, S., N. Rao, and R. Ge, *Emerging Roles of ADAMTSs in Angiogenesis and Cancer*. Cancers (Basel), 2012. **4**(4): p. 1252-99.
114. Huang, J., et al., *ADAMTS5 acts as a tumor suppressor by inhibiting migration, invasion and angiogenesis in human gastric cancer*. Gastric Cancer, 2019. **22**(2): p. 287-301.
115. Wang, A., et al., *LncRNA ADAMTS9-AS2 regulates ovarian cancer progression by targeting miR-182-5p/FOXF2 signaling pathway*. Int J Biol Macromol, 2018. **120**(Pt B): p. 1705-1713.
116. Dochez, V., et al., *Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review*. J Ovarian Res, 2019. **12**(1): p. 28.
117. Lv, Y., et al., *The effects and mechanisms of SLC34A2 on maintaining stem cell-like phenotypes in CD147(+) breast cancer stem cells*. Tumour Biol, 2017. **39**(4): p. 1010428317695927.
118. Bao, Z., L. Chen, and S. Guo, *Knockdown of SLC34A2 inhibits cell proliferation, metastasis, and elevates chemosensitivity in glioma*. J Cell Biochem, 2019. **120**(6): p. 10205-10214.
119. Fanayan, S., et al., *Mucin 1 (MUC1) is a novel partner for MAL2 in breast carcinoma cells*. BMC Cell Biol, 2009. **10**: p. 7.

120. Byrne, J.A., et al., *MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 497.
121. Hoskins, E., et al., *Paracrine SLPI secretion upregulates MMP-9 transcription and secretion in ovarian cancer cells*. Gynecol Oncol, 2011. **122**(3): p. 656-62.
122. Rasool, N., et al., *Secretory leukocyte protease inhibitor antagonizes paclitaxel in ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 600-9.
123. Yang, K., et al., *Identification of SERPINE1, PLAU and ACTA1 as biomarkers of head and neck squamous cell carcinoma based on integrated bioinformatics analysis*. Int J Clin Oncol, 2019. **24**(9): p. 1030-1041.
124. Brown, C.O., et al., *Scavenger receptor class A member 3 (SCARA3) in disease progression and therapy resistance in multiple myeloma*. Leuk Res, 2013. **37**(8): p. 963-9.
125. Bock, A.J., et al., *SCARA3 mRNA is overexpressed in ovarian carcinoma compared with breast carcinoma effusions*. Hum Pathol, 2012. **43**(5): p. 669-74.
126. Kuo, S.J., et al., *Significant elevation of CLDN16 and HAPLN3 gene expression in human breast cancer*. Oncol Rep, 2010. **24**(3): p. 759-66.
127. Qi, L., et al., *Single-Cell Transcriptomic Analysis Reveals Mitochondrial Dynamics in Oocytes of Patients With Polycystic Ovary Syndrome*. Front Genet, 2020. **11**: p. 396.
128. Gugnoni, M., et al., *Cadherin-6 promotes EMT and cancer metastasis by restraining autophagy*. Oncogene, 2017. **36**(5): p. 667-677.
129. Casal, J.I. and R.A. Bartolome, *Beyond N-Cadherin, Relevance of Cadherins 5, 6 and 17 in Cancer Progression and Metastasis*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(13).
130. Cheng, Z., et al., *Knockdown of EHF inhibited the proliferation, invasion and tumorigenesis of ovarian cancer cells*. Mol Carcinog, 2016. **55**(6): p. 1048-59.
131. Brenne, K., et al., *Expression of the Ets transcription factor EHF in serous ovarian carcinoma effusions is a marker of poor survival*. Hum Pathol, 2012. **43**(4): p. 496-505.
132. Tarhriz, V., et al., *Overview of CD24 as a new molecular marker in ovarian cancer*. J Cell Physiol, 2019. **234**(3): p. 2134-2142.
133. Zhang, R.R., L.M. Wang, and J.J. Shen, *Overexpression of miR-32 inhibits the proliferation and metastasis of ovarian cancer cells by targeting BTLA*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020. **24**(9): p. 4671-4678.
134. Peluso, J.J., *Progesterone signaling mediated through progesterone receptor membrane component-1 in ovarian cells with special emphasis on ovarian cancer*. Steroids, 2011. **76**(9): p. 903-9.
135. Zhu, X., et al., *PGRMC1-dependent autophagy by hyperoside induces apoptosis and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin treatment*. Int J Oncol, 2017. **50**(3): p. 835-846.
136. Kalinina, E.V., et al., *Expression of genes of glutathione transferase isoforms GSTP1-1, GSTA4-4, and GSTK1-1 in tumor cells during the formation of drug resistance to cisplatin*. Bull Exp Biol Med, 2012. **154**(1): p. 64-7.
137. Yin, H., et al., *Expression profiling of nuclear receptors identifies key roles of NR4A subfamily in uterine fibroids*. Mol Endocrinol, 2013. **27**(5): p. 726-40.
138. Karki, K., et al., *Nuclear receptor 4A2 (NR4A2) is a druggable target for glioblastomas*. J Neurooncol, 2020. **146**(1): p. 25-39.
139. Givant-Horwitz, V., et al., *The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(2): p. 517-23.

140. Nacarelli, T., et al., *NAMPT Inhibition Suppresses Cancer Stem-like Cells Associated with Therapy-Induced Senescence in Ovarian Cancer*. *Cancer Res*, 2020. **80**(4): p. 890-900.
141. Li, D., et al., *BRCA1 as a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent metabolic switch in ovarian cancer*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(16): p. 2564-71.
142. Godel, M., et al., *Small Nucleolar RNAs Determine Resistance to Doxorubicin in Human Osteosarcoma*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(12).
143. Luo, L., et al., *LncRNA SNORD3A specifically sensitizes breast cancer cells to 5-FU by sponging miR-185-5p to enhance UMPS expression*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(5): p. 329.
144. Tu, Z., et al., *An eight-long non-coding RNA signature as a candidate prognostic biomarker for lung cancer*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(1): p. 215-22.
145. Zhang, D., et al., *MicroRNA-616 promotes the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of HCC by targeting PTEN*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(1): p. 366-74.
146. Chen, Z., et al., *MicroRNA-616 promotes the progression of ovarian cancer by targeting TIMP2*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(6): p. 2960-2968.
147. Puthiyedth, N., et al., *Identification of Differentially Expressed Genes through Integrated Study of Alzheimer's Disease Affected Brain Regions*. *PLoS One*, 2016. **11**(4): p. e0152342.
148. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
149. Chen, S., et al., *miR-611 promotes the proliferation, migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells by targeting FOXN3*. *Oral Dis*, 2019. **25**(8): p. 1906-1918.

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

