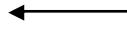


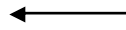
Adınızı soy adınızı giriniz

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 KANSERLİ AİLE BİREYLERİNDE TÜM GENOM
miRNA MOLEKÜLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ŞEREF BUĞRA TUNÇER

**DANIŞMAN
PROF. DR. HÜLYA YAZICI**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Kanser Genetiği Bilim Dalı Programında Doktora öğrencisi tarafından Prof.Dr.Hülya YAZICI'nın danışmanlığında hazırlanan "Over Kanseri Aile Bireylerinde Tüm Genom miRNA Moleküllerinin Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 27/09/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı
Prof.Dr.Vildan YASASEVER
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri Danışman
Prof.Dr.Hülya YAZICI
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr.Vakur OLGAC
İ.Ü.Onkoloji Enstitüsü
Klinik Onkoloji Anabilim Dalı



Jüri
Doç.Dr.Meral YÜKSEL
Marmara Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek
Okulu Tıbbi Hiz. ve Tek. Bölümü



Jüri
Y.Doç.Dr.Hülya TIĞLI BAŞKAYA
İst.Gelişim Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Yüksekokulu
Fizik ve Reh.Bölümü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Şeref Buğra Tunçer



İTHAF

Biricik kızım Zeynep Duru ve Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Akademik hayatıma başlangıcından bugüne kadar, her türlü fedakarlıkta bulunan, tez çalışmalarımın her aşamasında bana yön veren, yardım ve tavsiyelerde bulunan, tez danışmanım, çok değerli hocam *Prof. Dr. Hülya Yazıcı*'ya,

Değerli, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanımız, *Prof. Dr. Vildan Yasasever*'e,

Tez izleme aşamalarındaki yardımlarından dolayı *Doç. Dr. Vakur Olgaç*'a,

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürümüz *Prof. Dr. Ahmet Kizir*'e,

Temel Onkoloji Anabilim Dalımızda bulunan, özellikle Kanseri Genetiği Bilim dalında görev yapan desteklerini esirgemeyen tüm meslektaşlarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda olan ve sonsuz destekleri için sevgili ailem *Büşra Tunçer, Zeynep Duru Tunçer, Mustafa & Nurten Tunçer ve Berk Tunçer*'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-20140

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. Overler ve Malign Dönüşüm Aşamaları	4
2.2. Over Kanseri	4
2.3. Over Kanserinde Tedavi Yaklaşımları.....	6
2.4. Over Kanseri Biyolojisi	7
2.5. Over Kanseri Tanısı	8
2.6. Over Kanseri Evrelendirilmesi.....	8
2.7. Over Kanseri Sınıflandırması ve Risk Faktörleri.....	9
2.8. Kalıtsal Kanserler.....	11
2.8.1. Over Kanseri.....	11
2.8.2. Lynch Sendromu	13
2.8.3. Bölgeye Özgü Over kanseri	13
2.8.4. <i>BRCA1/BRCA2</i> Genleri ve Proteinleri	14
2.8.5. Kalıtsal ve Sporadik Over Kanseri	16
2.9. Yaşam Boyu Over Kanseri Riski	18
2.10. Over Kanseri Riskini Azaltıcı Faktörler	19
2.11. Monozigotik İkizler.....	20
2.11.1. İkiz Kardeşlerle Yapılan Çalışmalar	21
2.12. MikroRNA(miRNA).....	22

2.12.1. MikroRNA'ların Oluşum Mekanizması.....	24
2.12.2. MikroRNA'lar ve Kanser.....	26
2.12.3. Kanserde mikroRNA aktivitesinin çeşitli mekanizmalarla bozulması.....	27
2.12.3.1. miRNA ifade düzeyinin değişmesi.....	27
2.12.3.2. miRNA işlenmesinin değişmesi.....	28
2.12.3.3. miRNA: mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar.....	28
2.12.3.4. miRNA'larda mutasyonlar.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Kitler.....	29
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	30
3.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	30
3.4. Deney Yöntemleri.....	32
3.4.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu.....	32
3.4.2. miRNA İzolasyonu.....	32
3.4.3. miRNA'ların Safılık ve Konsantrasyon Analizleri.....	33
3.4.4. MikroArray Protokolü.....	36
3.4.4.1. Spike-in Solüsyonu hazırlanması.....	36
3.4.4.2. Örnek İşaretlenmesi ve Hibridizasyon.....	37
3.4.4.3. Örnek defosforilasyonu.....	37
3.4.4.4. Örnek Denatürasyonu.....	38
3.4.4.5. Örnek Ligasyonu.....	38
3.4.4.6. Örneklerin Hibridizasyonu ve Slaytlara Yüklenmesi.....	39
3.4.4.7. Hibridizasyon Düzeneklerinin hazırlanması.....	39
3.4.4.8. Yıkama ve Slaytların Taranması.....	40
3.4.4.9. Veri Analizi ve Örnekleri Değerlendirme.....	40
3.4.4.10. Biyoinformatik analizler.....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Biyolojik Materyalin Kalite Kontrol Verilerinin Değerlendirilmesi.....	42
4.2. MikroArray Aşamalarının Kontrolü ve Değerlendirilmesi.....	44
4.3. Çalışma Grupları Arasındaki miRNA Ekspresyon Farklılıklarının Değerlendirilmesi.....	47
4.4. miRNA'ların Hastalık Etiyolojisi, Mutasyon Taşıyıcılığı ve Hastalık Riski Açısından Değerlendirilmesi.....	55

5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	77
ETİK KURUL KARARI	90
İNTİHAL RAPOR FORMU	93
ÖZGEÇMİŞ	94



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Over kanserinde FIGO evrelemesi ve görüntüleme bulguları [27].....	9
Tablo 2-2: Kalıtsal over kanseri sendromlarının özellikleri [2].....	14
Tablo 2-3: <i>BRCA1/ BRCA2</i> genlerinin işlevleri ve etkileşimde oldukları önemli proteinler [53]	15
Tablo 2-4: <i>BRCA1</i> geninin ailesel ve sporadik over kanserindeki etkisi [41]	18
Tablo 2-5: Yaşam boyu kalıtsal ve sporadik over kanser riski [41]	19
Tablo 3-1: Kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlere ait bilgiler	29
Tablo 3-2: Kullanılan cihazlar ve detayları.....	30
Tablo 3-3: Kullanılan tampon, çözelti içerikleri ve bilgisayar programları	30
Tablo 3-4: “CIP Master Mix” hazırlanması	38
Tablo 3-5: “Ligation Master Mix” hazırlanması.....	38
Tablo 4-1: Örneklerle ait Nanodrop ölçüm değerleri.....	42
Tablo 4-2: Örneklerle ait Biyoanalizör ölçüm değerleri	43
Tablo 4-3: Monozigotik ikiz kardeşler arasında farklılık gösteren miRNA’lar.....	48
Tablo 4-4: <i>BRCA1</i> mutasyonu taşıyıcısı olan aile bireyleri ile olmayan aile bireyleri arasında farklılık gösteren miRNA’lar	48
Tablo 4-5: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcı over kanserli monozigotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı diğer aile bireyleri arasında farklılık gösteren miRNA’lar	50
Tablo 4-6: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcısı olan over kanseri monozigotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı olmayan aile bireylerinin karşılaştırılması sonucu farklılık gösteren miRNA’lar	51
Tablo 4-7: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcısı over kanserli monozigotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırılması sonucu artan ve azalan miRNA’lar	52
Tablo 4-8: Over kanseri hasta ve sağlıklı monozigotik ikiz kardeşler ile tüm aile bireyleri karşılaştırılması sonucu farklılık gösteren miRNA’lar.....	53
Tablo 4-9: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozigotik ikiz ile tüm aile bireyleri arasında farklılık gösteren miRNA’lar.....	54
Tablo 4-10: <i>BRCA1</i> genindeki mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA’lar ve bu miRNA’ların hedef molekülleri	55

Tablo 4-11: <i>BRCA1</i> genindeki mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri	55
Tablo 4-12: <i>BRCA1</i> genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri	56
Tablo 4-13: <i>BRCA1</i> genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri	57
Tablo 4-14: Epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri	58
Tablo 4-15: Epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri	59
Tablo 4-16: Epitelyal over kanserine yatkınlık ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve hedef molekülleri	59
Tablo 4-17: Epitelyal over kanserine yatkınlık ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA ve hedef molekülleri	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: DNA onarımı ve kalıtsal kanserlerin patogeneğinde <i>BRCA</i> ve <i>MMR</i> genlerinin rolü [38].	12
Şekil 2-2: Over kanserinde <i>BRCA</i> geninin fonksiyonunu ve fonksiyon kaybını gösteren şematik diyagram [53].	16
Şekil 2-3: <i>BRCA1</i> ilişkili kalıtsal over kanseri [62].	17
Şekil 2-4: miRNA'ların oluşum mekanizması [129].	25
Şekil 2-5: miRNA'nın işlevi [137].	26
Şekil 3-1: “Agilent 2100 Biyoanalizör” uygulamasında kullanılan araçlar.	36
Şekil 3-2: MikroArray uygulamasında kullanılan araçlar.	40
Şekil 4-1: Marker'a ait Biyoanalizör elektroferogramı.	43
Şekil 4-2: Örneğe ait Biyoanalizör elektroferogramı.	43
Şekil 4-3: Örneklere ait “QC Report” değerlendirilme sonuçları.	44
Şekil 4-4: Mikroarray problemlerinin normalizasyon öncesi ve sonrası logaritmik dağılım değerleri.	45
Şekil 4-5: Mikroarray problemlerin yoğunluklarının normalizasyon öncesi ve sonrası logaritmik dağılım değerleri.	45
Şekil 4-6: Euclidean metodu kullanılarak verilerin kümelenmesi ve sınıflandırılması.	46
Şekil 4-7: <i>BRCA1</i> mutasyonu taşıyıcısı olan ve olmayan aile bireyleri karşılaştırılmasına ilişkin Heat-Map grafiği.	49
Şekil 4-8: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcısı over kanseri monozyotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı diğer aile bireylerinin karşılaştırıldığı Heat-Map grafiği.	50
Şekil 4-9: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcısı over kanserli monozyotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldığı Heat-Map grafiği.	53
Şekil 4-10: <i>BRCA1</i> mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozyotik ikiz ile tüm aile bireylerinin karşılaştırıldığı Heat-Map Grafiği.	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**Kısaltmalar**

APC:	Adenomatous polyposis coli
Ark.:	Arkadaşları
ATM:	Ataxia telangiectasia mutated
BRCA1:	Breast Cancer 1
BRCA2:	Breast Cancer 2
BRAF:	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CA125:	Kanser Antijen-125
CA15-3:	Kanser Antijen -15-3
CCND1:	Cyclin D1
cDNA:	Complementary DNA
CTNNB1:	Cadherin-associated protein beta 1
DGCR8:	DiGeorge syndrome chromosomal region 8
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EGF:	Epidermal growth factor
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
EOK:	Epitelyal over kanseri
FIGO:	International Federation of Obstetrics and Gynecology
g:	gram
HNPCC:	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer
IGF2:	Insulin-like growth factor 2
kDa:	Kilo Dalton
KLL:	Kronik Lenfositik Lösemi
KRAS:	Kirsten-rous avian sarcoma
LOH:	Loss of heterozygosity
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
µL:	Mikrolitre
mL:	Mililitre
MLH1:	MutL homolog 1
MMR:	Mismatch Repair
mRNA:	Mesajcı RNA

miRNA: MikroRNA

MSH2: MutS homolog 2

ng: nanogram

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha

Pri-miRNA: Primer mikroRNA

Pre-miRNA: Prekürsör mikroRNA

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

QC: Quality control

RISC: RNA-induced silencing Complex

RPM: Revolutions per Minute

RNA: Ribonükleik asit

TP53: Tumor Protein 53

ÖZET

Tunçer, B.Ş. (2017). Over Kanserli Aile Bireylerinde Tüm Genom miRNA Moleküllerinin 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 jinekolojik kanserdir. Hastalar genellikle ileri evrelerde teşhis edilir ve 5 yıllık sağkalım oranı %40'dan azdır. Bununla birlikte, günümüzde erken teşhisi sağlayacak biyobelirteçlerin ve daha akıllı tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine acil bir ihtiyaç vardır. *BRCA1* ve *BRCA2* gen omik stabilite ve bütünlükte, hücre döngüsünün kontrolünde ve apoptozda birbirlerinden ayrılmaz roller oynamaktadır. *BRCA1* sendromu %87 oranında kadın meme kanseri gelişimiyle, %44 oranında da over kanseri gelişimi ile ilişkilidir. *BRCA2* sendromu ise %84 oranında kadın meme kanseri gelişimiyle, %7 erkek meme kanseri gelişimiyle ve %27 oranında da over kanseri gelişimiyle ilişkilidir. Kodlamayan RNA'ların bir alt kümesi olan mikroRNA (miRNA)'lar, genellikle 19-24 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, proteine dönüştürülmeyen, hedef mesajcı RNA'ların (mRNA) oluşumunu post-transkripsiyonel olarak düzenlediği düşünülen veya translasyonu baskılayan RNA molekülleridir. Over kanseriyle ilgili yapılan çalışmalarda da miRNA ifade düzeyinin farklılıkları gösterdiği rapor edilmiştir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda *BRCA* genleri açısından taranmış yüksek riskli over kanser ailesinde over kanseri hasta ve sağlıklı monozygotik ikizi başta olmak üzere tüm aileye miRNA mikroarray analizi yapıldı. Hasta ve sağlıklı aile bireyleri arasında yapılan karşılaştırmalar ve gruplamalar sonrası anlamlı olarak ekspresyonları artan ve azalan miRNA'lar tespit edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda *BRCA1* mutasyon taşıyıcılığı ve epitelyal over kanseri ile ilişkili, istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu artan toplam 38 miRNA olduğu saptandı. Bu miRNA'lar sırasıyla let-7a-5p, let-7b-5p, miR-1260a, miR-1260b, miR-1273g-3p, miR-1305, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-197-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-3651, miR-3653-3p, miR-425-5p, miR-4281, miR-4286, miR-4449, miR-4653-3p, miR-486-5p, miR-5100, miR-572, miR-5739, miR-574-5p, miR-6127, miR-6131, miR-6165, miR-6840-3p, miR-7114-5p, miR-7641, miR-7975, miR-7977, miR-874-3p, miR-92a-3p'den oluşmaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu azalan ise toplam 61 miRNA saptandı. Bu miRNA'lar sırasıyla let-7i-5p, miR-1225-5p, miR-125a-5p, miR-126-3p, miR-142-3p, miR-15b-5p, miR-150-5p, miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-2861, miR-29a-3p, miR-30d-5p, miR-3135b, miR-3196, miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-320e, miR-324-3p, miR-328-3p, miR-342-3p, miR-3656, miR-3665, miR-3960, miR-4284, miR-4428, miR-4430, miR-4466, miR-451a, miR-4516, miR-4530, miR-4687-3p, miR-4697-5p, miR-4741, miR-4787-5p, miR-484, miR-494-3p, miR-5001-5p, miR-5006-5p, miR-564, miR-5787, miR-6068, miR-6087, miR-6088, miR-6089, miR-6090, miR-6124, miR-6125, miR-638, miR-664b-5p, miR-6510-5p, miR-6800-5p, miR-6869-5p, miR-6891-5p, miR-7107-5p, miR-766-3p, miR-7704, miR-7847-3p, miR-8063, miR-8069'dan oluşmaktadır. Bu miRNA'ların ileriki çalışmalarla genel popülasyonda hasta ve sağlıklı kontroller ile korelasyonu ve validasyonu yapılacaktır. Validasyonun ardından, epitelyal over kanserinin tanısında ve izlenmesinde kullanılabilecek girişimsel olmayan yeni biyobelirteçler belirlenmiş olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Epitelyal Over Kanseri, *BRCA1/2* genleri, miRNA, mikroarray, biyobelirteç. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-20140

ABSTRACT

Tunçer, B.S. (2017). Investigation of Whole Genome miRNA Molecules in Ovarian Cancer Patients and Their Family Members. Istanbul University Health Sciences Institute, Department of Basic Oncology. Doctoral Thesis. Istanbul

Ovarian cancer is the second most common gynecologic cancer with high rate of malignancy and mortality among gynecological cancers. Patients are usually diagnosed at advanced stages and the 5-year survival rate is less than 40%. As result, Methods for early-detection and tailored treatment options need to be developed and new biomarkers will be provided to monitoring disease. BRCA1 and BRCA2 have important roles regulating genome stability and integrity, and also controlling the cell cycle and apoptosis. BRCA1 syndrome is associated with 87 % risk of female breast cancer development and 44% of ovarian cancer development. Whereas, BRCA2 syndrome is associated with 84 % of female breast cancer development, 7 % male breast cancer development and 27% ovarian cancer development. MicroRNAs(miRNA), a subset of the non-coding RNAs, that are single-stranded, usually 19-24 nucleotides in length, untransformed to protein and are thought to be regulated cleavage of target mRNAs, post-transcriptionally and translationally repressed mRNA molecules. In our study, miRNA array analysis was performed in high risk-BRCA mutation carrier ovarian cancer family with including one healthy and one ovarian cancer monozygotic twin and the rest of family members. The levels of miRNA expressions have been reported in ovarian cancer in many studies. the increased or decreased miRNAs were determined after the comparisons of between patient and healthy family members and also between different groups. In the obtained data, 38 miRNAs were shown statistically significant high expression levels related to the epithelial ovarian cancer with carriers of BRCA1 mutation. These miRNAs were let-7a-5p, let-7b-5p, miR-1260a, miR-1260b, miR-1273g-3p, miR-1305, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-181b-5p, miR-197-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-3651, miR-3653-3p, miR-425-5p, miR-4281, miR-4286, miR-4449, miR-4653-3p, miR-486-5p, miR-5100, miR-572, miR-5739, miR-574-5p, miR-6127, miR-6131, miR-6165, miR-6840-3p, miR-7114-5p, miR-7641, miR-7975, miR-7977, miR-874-3p, miR-92a-3p. Conversely 61 miRNAs were shown statistically significant decreased expression levels and these were let-7i-5p, miR-1225-5p, miR-125a-5p, miR-126-3p, miR-142-3p, miR-15b-5p, miR-150-5p, miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-2861, miR-29a-3p, miR-30d-5p, miR-3135b, miR-3196, miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-320e, miR-324-3p, miR-328-3p, miR-342-3p, miR-3656, miR-3665, miR-3960, miR-4284, miR-4428, miR-4430, miR-4466, miR-451a, miR-4516, miR-4530, miR-4687-3p, miR-4697-5p, miR-4741, miR-4787-5p, miR-484, miR-494-3p, miR-5001-5p, miR-5006-5p, miR-564, miR-5787, miR-6068, miR-6087, miR-6088, miR-6089, miR-6090, miR-6124, miR-6125, miR-638, miR-664b-5p, miR-6510-5p, miR-6800-5p, miR-6869-5p, miR-6891-5p, miR-7107-5p, miR-766-3p, miR-7704, miR-7847-3p, miR-8063, miR-8069. The miRNAs were found will be validated in large cohorts having ovarian patients and healthy controls in future study. After the study of validation, new non-invasive biomarkers will be identified for diagnosis and prognosis of epithelial ovarian cancer.

Key words: Epithelial Ovarian Cancer, *BRCA1/2* genes, miRNA, microarray, biomarker. This work was supported by the Istanbul University Scientific Research Projects Unit. Project No: TDK-2016-20140

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya çapında her yıl ortalama 239.000'den fazla kadında over kanserinin teşhis edildiği ve bu kadınların yaklaşık 152.000'inin hayatını bu hastalık nedeniyle kaybettiği tahmin edilmektedir. Bu veriler over kanserinin jinekolojik kanser ölüm oranının önemli bir nedeni olduğunu ortaya koymaktadır [1]. Amerika Birleşik Devletleri'nde over kanseri, kadınlarda en sık görülen kanserler arasında altıncı sırada yer almaktadır. Jinekolojik kanser türleri arasında ise malignite ve mortalite oranı yüksek olan ve en sık görülen ikinci jinekolojik kanserdir [2]. T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser Dairesi istatistiklerine göre 2014 yılında over kanserinin görülme sıklığı yüz binde 6,1'dir. Globocan 2012 yılı verilerine göre Türkiye'de yılda 2400 kadının over kanseri teşhisi aldığı ve ortalama 1588 kadının over kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir, 5 yıllık sağkalım oranları ise %37,4 olarak verilmiştir [3, 4]. Günümüzde yeni teşhis edilen over kanseri için geçerli olan standart optimal tedavi sitoredüktif cerrahi ile platin bazlı kemoterapi kombinasyonudur. Radikal cerrahi ve kemoterapi stratejilerindeki önemli ilerlemeler, klinik sonuçların iyileşmesine yol açsa da tüm bu gelişmelere rağmen, nüks ve tedaviye direnç açısından önemli riskler bulunmaktadır ve bunlar gerçekleştiğinde, over kanseri halen tedavisi gerçekleştirilemeyen bir tümör olarak kalmaktadır [5]. Bu nedenle, günümüzde erken teşhisi sağlayacak biyobelirteçlerin ve daha akıllı tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine acil bir ihtiyaç vardır. Over kaynaklı birçok tümör, oluştukları anatomik yapılara göre; yüzey epitelyal-stromal tümörler, sex kord-stromal tümörler ve germ hücreli tümörler olmak üzere 3 ana kategoride sınıflandırılmakta ve bu hücre kaynaklarından gelişmektedirler. Malign over tümörlerinin yaklaşık %90'ını ise overin yüzey epitelinden köken alan Epitelyal Over Kanseri (EOK) oluşturmaktadır [6]. Over kanser vakalarının çoğu (%70) ileri evrelerde (evre III ve IV) teşhis edilir ve 5 yıllık sağkalım oranı %40'dan azdır. Evre I'de tanısı konulan EOK'lı olguların 5 yıllık sağkalım oranı %80-90'a, Evre II'de teşhis edilen olguların ise sağkalım oranı %60-70'e kadar çıkmaktadır [7]. Mevcut over kanseri biyobelirteçleri kanser antijen-125 ve kanser antijen-15-3 (CA125, CA15-3), klinik olarak teşhis edilen hastalık için hassasiyete sahiptir. Ancak çok azı erken evre hastalık tanısında ve malign oluşumların benign oluşumlardan ayrılmasında yüksek duyarlılığa sahiptir [8].

Araştırmacıların çoğu over kanserinin erken teşhisinde kullanılabilecek biyobelirteçlerin ve stratejilerin mutlaka en az %10 oranında pozitif tahmini değerine ulaşması gerektiğini savunmaktadırlar [9]. Yılda 40/100.000 insidansa sahip post-menopozal bir popülasyonun taranmasında görüntüleme teknikleriyle kombine kullanılacak tanı testinin %99,6 asgari pozitif tahmini değerine ulaşması gerekmektedir [8]. Halen günümüzde over kanseri taraması ve erken evrelerde teşhisini sağlayacak onaylanmış yüksek hassasiyete ve yalnızca malignite tespiti yapabilen bir klinik test bulunmamaktadır. Bu nedenle, over kanseri için yeni tanısal biyolojik belirteçlerin tanımlanmasına gereksinim duyulmaktadır. Kanser çalışmalarında mikroRNA'ların (miRNA) kanser hücreleri ve normal hücreler arasında ekspresyon düzeyinin karşılaştırılabilir olması oldukça önemlidir. miRNA'lar, mesajcı RNA'ları (mRNA) hedef alarak gen ekspresyonunu düzenleyebilen 19-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan düzenleyici RNA'lardır [10]. miRNA'lar gen ekspresyonunun posttranskripsiyonel düzenlenmesinde önemli rol oynarlar, ayrıca organ oluşumu, gelişim, hücre çoğalması, farklılaşma gibi birçok biyolojik ve metabolik aşamayı kontrol ederler [11]. Birçok çalışmada miRNA genlerinin %50'sinden daha fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgeler ya da kırılgan bölgeler içerisinde yer aldıklarını bildirilmiştir [12, 13]. Bu bulgular miRNA'ların kanser tanısında kullanılabileceğini ve onların kanser patogenezinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Diğer bir husus olan miRNA genlerinin ekspresyon profilleri analizi, birçok çalışmada primer tümörlerde, tümörden türetilmiş hücre soylarında ve normal dokularda miRNA mikroarray teknolojisi kullanarak araştırılmıştır [14, 15]. Literatürde over kanserinde, monozigotik ikiz kardeşlerin birbiri ile karşılaştırıldığı ve farklılıkların aynı aileye mensup sağlıklı diğer kardeşlerle karşılaştırıldığı herhangi bir miRNA array çalışması mevcut değildir.

Planlanan bu tez çalışmasında miRNA mikroarray teknolojisi kullanılarak, over kanserinde değişiklik gösteren miRNA'ların ekspresyon düzeyi ile bu miRNA'larla ilişkili genlerin belirlenmesi ve bunların over kanserinin etiyolojisindeki yerinin ne olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla başlatılan çalışmada, over kanser riski yüksek bir aileye mensup biri over kanser tanısı almış monozigotik ikiz kardeşlerle, bunların diğer sağlıklı kardeşleri arasında fenotip farklılığına yol açan faktörün, miRNA farklılıkları olup olmadığı incelenmiştir. Yüksek riskli aileye mensup, monozigotik ikiz kardeşlerden etkilenmiş ve etkilenmemiş iki farklı fenotipe sahip, aynı genotipi taşıyan kardeşler arasında miRNA farklılıkları ortaya koyularak over kanseri etiyolojisinde önemli olabilecek miRNA'lar belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca monozigotik ikizler arasında ekspresyon farklılıkları gösteren miRNA'lar, aynı aileye mensup diğer sağlıklı kardeşler ile karşılaştırılarak, normal populasyon ile yüksek riskli aile gruplarında hastalığa yatkınlık oluşturabilecek miRNA farklılıkları belirlenmiştir. Gruplar arasındaki miRNA değişikliklerinin over kanserinin erken teşhisi ve prognozunun tahmin edilmesinde yeni biyolojik belirteç olup olmayacakları da değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Overler ve Malign Dönüşüm Aşamaları

Kadın üreme organları, dış ve iç üreme organları olmak üzere iki bölümde incelenir. İç genital sistem organlarından overler, yerleşim olarak kadının pelvisinde, rahmin her iki tarafında, fallop tüplerinin uçlarının yakınlarında lateral pelvik duvarını örten yapılardır. Overler bir kadının üreme sistemindeki yumurtaları ve dişi cinsiyet hormonları olan östrojen ve progesteron hormonunu üreten organlardır. Yaklaşık olarak 3,5 cm uzunluğunda, 1,2 cm kalınlığında ve 5 gr ağırlığında badem şeklindeki yapılardır [16]. Teorik olarak bakıldığında overlerin oluşumunda ve işlevlerinde görev alan tüm hücre tipleri malign oluşumlar için bir potansiyele sahiptir. Ancak malign over tümörlerinin büyük çoğunluğu over yüzey epitelinden kaynaklanmaktadır. Bu hücrelerin üreme hayatında önemli işlevleri vardır, folikül rüptürüne katkıda bulunurlar ve hücre bölünmesiyle ovülasyona eşlik eden deformasyonları onarırlar. Bu onarım ile ilişkili hücre bölünmesinin kontrolsüz ve anormal bir şekilde olması, over kanseri gelişimine önemli ölçüde katkıda bulunduğu yönünde birçok görüş mevcuttur. Bu görüşler, over kanserinin en sık kadınların üreme hayatının sonunda ve nulliparite ile bağlantılı olduğu gözlemine dayanır. Diğer önem taşıyan bir husus ise, çoğu epitelden farklı olarak over epitelindeki hücreler belirli bir evrenin sonunda yenilenme ve büyüme potansiyeline sahip kök hücreler ile yer değiştirmezler. Daha ziyade, bir over yüzey epitel hücresinin bölünmesi, bir sonraki potansiyel bölünme için eşit potansiyele sahip iki kardeş hücrenin üretilmesini sağlamaktır. Bu evrelerin tamamında biriken potansiyel mutasyonlar, her bölünme sonrası oluşan ek mutasyonlarla katlanarak ve genişleyerek sonraki nesiller için malign fenotipe katkıda bulunur ve over kanserinin oluşumuna zemin hazırlarlar [17, 18].

2.2. Over Kanseri

Amerika Birleşik Devletleri'nde kadınlar arasında over kanseri altıncı en sık rastlanan kanser ve ikinci en sık görülen jinekolojik kanserdir. Over kanseri hücreleri öncelikle periton boşluğunda yayılır ve sadece yüzeysel olarak invaziv olduğundan, over kanser biyolojisi hematojen olarak metastatik tümörlerin biyolojisinden farklıdır.

Bununla birlikte, hızla çoğalan tümör iç organları sıkıştırdığından ve tedavi sırasında belirli dönemlerde geçici olarak kemoterapiye duyarlı olduğundan, over kanseri ölümcül bir hastalıktır ve ileri evrelerde ortalama %30'luk bir iyileşme oranına sahiptir [2]. Over kanserine yol açan genetik ve epigenetik birçok değişiklik bulunmaktadır. Over karsinomu, fallop tüpü ve mezotelyum kaplı peritoneal boşluk ve over yüzey hücreleri olmak üzere üç potansiyel bölgenin herhangi birinden kaynaklanabilir [5]. Over kanserine ilişkin tümöröenez, aşamalı bir mutasyon süreci boyunca düşük malignite potansiyelli over tümörü olarak bilinen, Borderline over tümöründen, iyi differansiye karsinomaya ilerler (tip I) veya hızlı bir şekilde metastaz yapan genetik olarak kararsız yüksek dereceli bir seröz karsinomu içerir (tip II). Tümöröenezin başlangıcı sırasında, over karsinom hücreleri, epitelyal mezenkimal geçişe girer. Bu geçiş, Kaderin ve İntegrin ekspresyonunda bir değişikliğe ve proteolitik yolların upregülasyonuna neden olur. Peritoneal sıvı tarafından taşınan kanser hücreleri etrafa dağılır. Hücreler hem birbirlerine, hem de içerisinde bulunduğu ekstraselüler matrikse bağlı olarak yaşarlar. Hücrelerin içerisine gömüldüğü bu ekstraselüler matriks, bir tür iskelet gibidir ve kanser hücreleri bu matriksden ayrılarak genellikle abdominal peritona veya omentuma yapışır ve burada kanser hücreleri epitelyal fenotiplerine geri dönerler. Metastazın başlangıç aşamaları, adezyon reseptörleri, hücre adezyon molekülleri ve proteazların kontrollü bir etkileşimi ile düzenlenir ve geç metastaz, mezotel kaplı yüzeylerdeki tümör nodüllerinin onkogenik aktivasyon kaynaklı hızlı büyümesi ile karakterize olup, abdomen iltihapı veya su toplanmasına, bağırsak tıkanıklığına ve iştahı baskılayan tokluk hissine yol açan biyokimyasal maddelerin salgılanmasına yol açar (tümör kaşeksi) [18]. Over kanserine sahip hastaların genellikle %69'u hastalığa yenik düşmektedir, bu oran meme kanserli hastalarda %19'dur. Over kanserindeki yüksek mortalite oranı, hastaların büyük çoğunluğunun ileri evrede teşhisi ve periton boşluğundaki yaygın metastatik alanlar ile açıklanmaktadır. Over kanser metastazı, over veya fallop tüpü tümörlerinin komşu organ mesane veya kolona doğrudan doğruya metastazı olarak veya vücudun başka bir noktasına direkt primer tümör hücrelerinin ulaşması olarak gerçekleşmektedir. Hücre matriksinden ayrılan tümör hücreleri, fizyolojik olarak peritoneal sıvı ile periton boyunca taşınır ve karın boşluğunda yayılır.

Tümör hücreleri tarafından peritoneal boşluğun yaygın ekimi, özellikle gelişmiş, yüksek dereceli seröz karsinomlarda, tümör kaşeksi ile ilişkilidir. Bu tip tümörler hızla büyür, erken metastaz yapar ve çok agresif bir hastalık seyri gösterirler. Diğer kanserlerden farklı olarak, over kanseri nadiren vasküler yolla yayılmaktadır. Buna karşın over kanserinde pelvik veya paraaortik lenf nodlarında tutulum gözlemlenebilir [19, 20]. Genellikle over karsinomlu hastalar sigmoid kolon ve üreme organlarını da içine alan pelvik bölgesinde lokal ileri hastalığa sahiptir. Omentum 20 x 15 x 2 cm boyutlarında bağırsakları ve karın boşluğunu örten bir yağ yastığı olarak görev alır ve neredeyse her zaman over tümör hücreleri tarafından transforme edilir. Omental tümörler mide ve bağırsaklarda tıkanıklık meydana getirerek hastalarda ciddi ağrılara neden olurlar [20].

2.3. Over Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

İleri over kanseri tedavisinde en güncel tedavi seçeneği olarak genellikle agresif cerrahi tercih edilmektedir. Pelvis bölgesindeki tümörü temizlemek için cerrahi genellikle over tümörlerinin, üreme organlarının ve sigmoid kolonun rezeksiyonu ve sonrası anastomozunu gerektirir. Bu cerrahinin teknik olarak mümkün olmasının nedeni, over tümörlerinin periton boşluğunda yayılıp sadece mezotelyal hücre yüzeyini istila etmesidir. Büyük omental tümörlerde dahi, yüzeysel bağırsak seröz yapısının işgali gerçekleşse de, kas dokusuna herhangi bir infiltrasyon görülmediğinden transvers kolonun çıkarılmasına gereksinim görülmemektedir [21]. Cerrahinin amacı, mümkün olduğunca tümörü çıkarmaktır, çünkü birçok çalışma, tümör yükü azalmasının hasta sağkalımıyla doğru orantılı olduğunu göstermiştir [22, 23]. Over kanserlerinin cerrahi sitoreduksiyonu diğer kanserlere kıyasla, over kanseri biyolojik davranışında ciddi bir farklılığın göstergesidir, çünkü diğer kanserlerin çoğunda metastatik tümörlerin çıkarılmasının sağkalımı arttırdığı bulunmamıştır. Postoperatif olarak, çok iyi diferansiye olmuş erken evre kanseri olanlar dışındaki tüm kadınlara platin veya taksan sınıfı kemoterapi uygulanır. En uygun tedavi uygulama şekli hala önemli bir tartışma konusudur. Şu an için optimum tedavi olan cerrahi sonrası 1cm'den küçük tümörü olup, intraperitoneal kemoterapi alan hastalar, sadece intraperitoneal kemoterapi alan hastalarla karşılaştırıldığında, progresyonsuz sağkalım 5 ay, genel sağkalım ise 15 aylık bir artış göstermektedir [24].

Bu optimum tedavi şekli için gerekçe olarak over karsinomlarının genellikle abdominal boşlukla sınırlı olduğu gözlemine dayanmaktadır ve tümör yükü azaltılmış hastalarda intraperitoneal kemoterapinin, peritoneal boşlukta çok yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaştığını gösteren farmakodinamik çalışmalarla bu tedavi şeklinin daha da başarılı olduğu gösterilmiştir [24].

2.4. Over Kanseri Biyolojisi

Over kaynaklı birçok tümör oluştukları anatomik yapılara göre; yüzey epitelyal-stromal tümörler, sex kord-stromal tümörler ve germ hücreli tümörler olmak üzere 3 ana kategoride sınıflandırılmakta ve bu hücrelerden gelişmektedirler. Her bir kategori de birçok alt türü içermektedir. Tek bir tümör içerisinde birbirine sıkıca karışmış ya da yan yana bulunan farklı alt tiplerin kombinasyonları, bazı frekanslarla bulunabilir. İki veya daha fazla alt türü içeren tümörler patolojik olarak karışık ya da miks tip olarak nitelendirilir ve tümörün kategorisi tüm bu alt sınıflardan faydalanılarak tanımlanır. Patolojik sınıflandırmada toplam tümör kütlelerinin %10'un dan azını oluşturan tümör alt türleri yok sayılır [2, 17].

Ovaryum yüzey epiteli, histolojik olarak pelvik ve abdominal boşlukların yüzeyini örten epitelyum olan mezotele benzemektedir. Bu benzerlik, aynı zamanda, over epitelyal stromal tümörlerin, pelvis ve karın içinde ortaya çıkan bazı epitel tümörlere morfolojik olarak benzerliği, over yüzey epitelinin ve mezotelin kökenlerinin ortak olduğu ile açıklanabilir [2, 17]. Sex kord-stromal tümörler ise mezenkimal ve mezonefrik kökenli tümörleri içerir. Bu tümörlerin bazıları, yani fibromalar ve tekomalalar fibroz görünüme sahiptir ve bazıları granüloza hücrelerinden veya bunların seks kordonları olan Leydig ve Sertoli hücrelerinden türemiştir [2, 17]. Overin germ hücreleri, germ hücreleriyle özdeş olan bazı tümörleri oluşturmaktadır. Yolk kesesi ve gelişmekte olan gonadlar arasında, göç sırasında kaybolmuş veya sapmış olan germ hücreleri, gonadların dışında germ hücreli tümörlere dönüşebilir [6]. Bu kategorilerden epitelyal over kanseri en yaygın görülen over malignitesidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2009 yılı için tahmin edilen epitelyal over kanser vakasının 21.550 olacağı ve aynı yıl içinde 14.600 kadının da bu hastalıktan hayatını kaybedebileceği bildirilmiştir [25]. Hastalık genel olarak postmenopozal kadınlarda ve ortalama olarak 63 yaş civarında görülür. [26].

Epitelyal over karsinomalı kadınların yaklaşık %70'inde tanı sırasında hastalık ilerlemiş düzeydedir ve kadınların % 65'i teşhis konulduktan sonraki 5 yıl içinde hayatlarını kaybetmektedir. Evre IV hastalıklı kadınlarda ortalama sağkalım süresi yaklaşık 3 yıldır. Epitelyal over kanserlerine erken evrelerde tanı koymak oldukça zordur. İlerlemiş hastalığı olan hasta kişiler dahi, spesifik abdominopelvik belirtilere sahip olmayabilirler. Buna ek olarak, erken tanıya yardımcı olabilecek güvenilir bir biyolojik belirteç ne yazık ki henüz bulunmamaktadır [27].

2.5. Over Kanseri Tanısı

Son birkaç dekatta sayısız yeni biyolojik belirteç, tanı veya tedavi etkilerini izlemek üzere değerlendirildi ve tanımlandı. Bunlardan en iyi bilineni CA 125'dir. CA 125, en çok yüksek dereceli seröz karsinomlarda seviyesi yükselen yararlı bir biyolojik belirteç olmasına rağmen, yükselmiş CA-125 seviyeleri müsinöz veya berrak hücreli tümörler ile erken evre kanserlerin yalnızca %50-60'ında görülür [28]. Son zamanlarda leptin, prolaktin, osteopontin, insülin benzeri büyüme faktörü II, makrofaj inhibe edici faktör ve CA-125 olmak üzere altı belirteğin birlikte kullanımının over kanseri tanısında tek başına CA-125'in kullanımından daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir [29]. Buna ek olarak, kallikrein veya proteaz M gibi proteolitik enzimlerin plazma düzeyi evre III veya IV hastalık için %63-75 düzeyinde duyarlılık gösterirken, seröz alt tip için ise %68'lik duyarlılık gösterdiği gözlenmiştir. Osteopontin'in belirteç olarak kullanımı ise herhangi bir histolojik duyarlılık olmaksızın %80-85'lerde olup, bu duyarlılık düzeyi ümit vericidir [30]. Mevcut en iyi tarama araçlarıyla dahi, yüksek dereceli seröz karsinomların erken evrelerde yakalanmasını nadiren gerçekleştirmektedir. Bu nedenle genetik olarak over kanseri açısından yüksek risk taşıyan kadınların yılda en az bir kez taranması mortaliteyi azaltmada ciddi faydalar sağlayacaktır [31].

2.6. Over Kanseri Evrelendirilmesi

Epitelyal over kanserinde sıklıkla kullanılan evreleme yöntemi FIGO (International Federation of Obstetrics and Gynecology) sistemidir. Overler dışında ek tutulumun görüldüğü pelvis içi tutulumlar evre II'yi, pelvise ek olarak intraabdominal tutulumlar ve lenf nodu tutulumları evre III'ü, intraabdominal tutulumlara ek intrahepatik ve abdomen dışı uzak metastazların olması da evre IV'ü gösterir. Over kanserinin evrelendirilmesi Tablo 2-1'de özetlenmiştir [27].

Tablo 2-1: Over kanserinde FIGO evrelemesi ve görüntüleme bulguları [27]

EVRE	Tutulum Bölgesi	Görüntüleme Bulguları
I	Tümör overler ile sınırlı	Overlerin Büyümesi
II	Overler ve pelvis içi tutulum	Kalın bağırsak, pelvik yan duvar veya üreter tutulumu
III	İntraabdominal tutulumlar ve lenf nodu tutulumları	Peritoneal veya omental kiteller, karaciğer veya dalak yüzeyinin tutulumu
IV	Karaciğer parenkimal tutulumu veya abdomen dışı uzak metastazlar	Karaciğerde parenkimal tortular, uzak organ metastazları

2.7. Over Kanseri Sınıflandırması ve Risk Faktörleri

Amerika Birleşik Devletleri'nde bir kadının hayat boyu over kanserine yakalanma riski 1/70 olarak vurgulanmaktadır. Bununla birlikte, birinci derece akrabasında hastalığa sahip kadının riski ise 1/30'a yükselmektedir. Bu nedenle, en önemli risk faktörü pozitif bir aile öyküsüdür. EOK karakteristik sitogenetik özellikler gösteren, kendine özel moleküler mekanizmaları ve sinyal yolları olan çeşitli alt tiplere sahip olan heterojen bir hastalıktır [2]. Histopatoloji ve sitogenetikteki son gelişmelerle, epitelyal over kanserinin patolojik ve fizyolojik özellikleri ile ilişkili bilgi edinilmiştir. Belirgin olmayan semptomlar, güvenilir biyolojik belirteçlerin olmaması, ileri hastalık tanısı ve ilaca dirençli histolojik tiplerin bulunması, epitelyal over kanseri için uzun dönem tedavi oranlarını ve prognozu sınırlar. Böylece epitelyal over kanseri en ölümcül jinekolojik malignite haline gelmektedir. En sık görülen alt tip olan yüksek dereceli seröz karsinomlar genellikle hastalığın overlerin ötesine yayılımı ile ortaya çıkarken, düşük dereceli seröz ve müsinöz karsinomlar genellikle erken dönem hastalıkla ortaya çıkar ve sonuç olarak mükemmel bir prognoz gösterir. Patolojik ve genetik mekanizmalara dayanarak, son bulgular over karsinogenezi için tip I ve II'yi içeren bir model olduğunu vurgulamıştır. Tip I(düşük dereceli seröz, müsinöz ve endometrioid) kanserler genellikle iyi tanımlanmış, genetik olarak kararlı öncü lezyonlardan (genellikle borderline tümörlerden) kaynaklanır. Erken evre hastalığı olan geniş adneksiyal kitleler halinde ortaya çıkar ve genel olarak iyi prognoza sahip nispeten yavaş bir klinik seyri vardır.

Buna karşılık, tip II karsinomlar(yüksek dereceli seröz, endometrioid, karışık ve farklılaşmamış varyantlar) adneksiyal epitelden ortaya çıkarlar, sıklıkla kromozomal instabilite gösterirler ve agresif klinik seyri gösterirler [2, 5, 17]. Son çalışmalar, epitelyal over kanseri'nin farklı histolojik alt tipleri ile spesifik risk faktörleri arasında yakın bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Nulliparite, over kanseri riskini arttırırken, gebelik, laktasyon, kistik tedavi harici oral kontraseptif kullanımı ve tubal ligasyon risk azalması ile ilişkilidir. Artmış ovülasyon döngüsü non-müsinöz alt tip için artan bir risk faktörüken, erken yaş menstrüasyon başlangıcı ve geç menapoz endometrioid alt tip için, genital bölgeye talk pudra uygulaması ise invaziv seröz ve müsinöz alt tipler için bir risk faktörüdür. Öte yandan oral kontraseptif kullanımı, çoğul ve çok gebelik sayısı gibi yumurtlama döngüsünün sayısını azaltan faktörler genelde tüm alt gruplar için koruyucu özellik göstermektedir. Uzun süreli (12-18ay) laktasyon bir diğer risk azaltıcı faktördür [2, 32].

Over kanserlerinin gelişim mekanizmaları ile ilgili tartışmalara rağmen over kanserlerinin % 90'ının over yüzey epitelinden kaynaklandığı düşünülmektedir [33]. Epitelyal over kanserinin hangi hücreden köken aldığı halen tartışma konusudur. Over karsinogenezi, muhtemelen çeşitli etkilere maruz kalan yüzey mezotel epitelinin metaplaziye uğrayarak Müllerian epiteline dönüşmesi ile açıklanmaktadır. Günümüzde kabul edilen hipoteze göre de, yüzey epiteli epitelyal over kanserinin kaynağıdır [34]. Pluripotent yüzey mezotelinin çeşitli histolojik alt tiplere ayrıldığı hipotezi, sürekli tekrarlanan ovülasyonun, over mezotelinde değişikliklere yol açtığını ve inklüzyon kistleri oluşturduğunu ileri süren, kesintisiz ovülasyon teorisi tarafından desteklenir. Inklüzyon kistlerini çevreleyen epitel hücreleri, epitelyal over kanseri gelişimine yol açan somatik büyüme faktörlerini salgırlar. Over kanserlerinin histomorfolojik özelliklerinin, mezotelyal tümörler yerine müllerian tümörlerin histomorfolojik özelliklerine benzediğini belirtmek gerekir. Zaten müllerian farklılaşmasına uğramış hücrelerin over kanserine neden olması, fallop tüpü (seröz), endometriyal (endometrioid), endoservikal (müsinöz) ve vajinal (berrak hücreli) kanserlerinin farklı histolojik alt tiplerinin oluşumunu açıklayabilir. Böylece, over kanserlerinin oluşumu için alternatif teori, bu kanserlerin yüzey mezotel epitelinden değil müllerian sistemden kaynaklandığını savunmaktadır [32, 35].

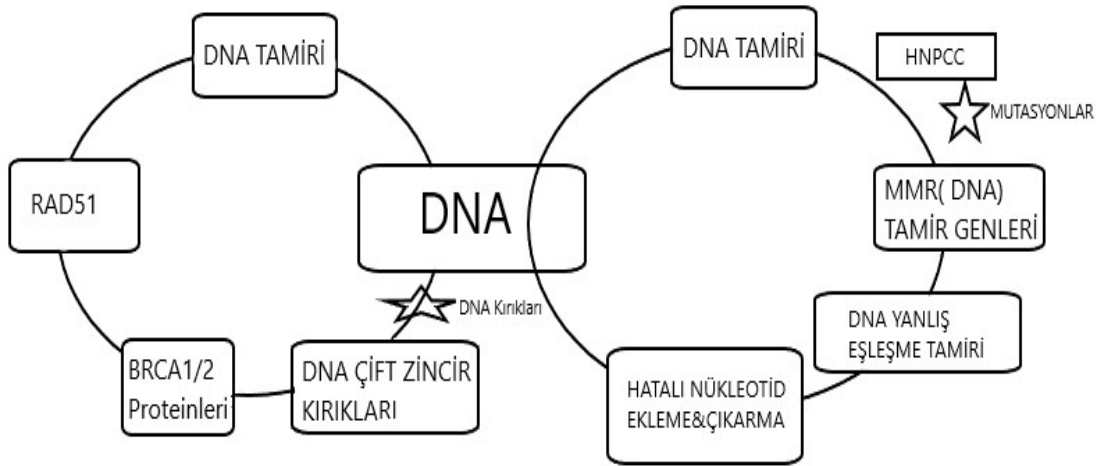
2.8. Kalıtsal Kanserler

2.8.1. Over Kanseri

Çeşitli çalışmalar yüksek veya düşük dereceli seröz, endometrioid ve berrak hücreli karsinomların, sırasıyla *TP53*, *K-ras*, *BRAF*, *CTNNB1* ve *PIK3CA* genlerini içeren mutasyonlar ile karakterize edildiğini göstermiştir. Patoloji ve genetikteki son gelişmeler, epitelyal over kanserlerinin farklı histolojik alt tiplerinin, kemoterapiye yanıt ve prognozu kısmen belirleyen belirgin risk faktörleri olduğunu ayrıca bu faktörlerin genetik anomalilere ve onkolojik yollara bağlı olduklarını da göstermektedir. Buna örnek olarak yüksek dereceli seröz karsinomların, yüzey epiteli kaynaklı, sıklıkla *TP53* mutasyonu taşıyan de novo tümörler olduğu düşünülürken, düşük dereceli seröz ve müsinöz karsinomların seröz müsinöz sınır çizgisinden kademeli olarak *K-ras* mutasyonları sonucu ortaya çıktığı varsayılmaktadır [2].

Ayrıca berrak hücreli ve endometriyal karsinomların büyük çoğunluğu endometriozisin arka planında *PTEN*, *PI3KCA* ve *CTNNB1* gen mutasyonları ile karakterizedirler [36]. Kalıtsal over kanseri, tüm over kanserlerinin % 5 ila 10'unu oluşturur, sporadik olan vakalara göre daha erken yaşta ve agresif dereceli tümörlerin gelişimi ile karakterizedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *BRCA* genlerini inaktive edici mutasyonlara sahip hastalarda görülen çoğu yüksek dereceli seröz over karsinomlarının fallop tüp fimbriasından kaynaklandığı ve tubal intraepitelyal karsinomda da bulunan *TP53* gen mutasyonlarının bu oluşuma eşlik ettiği bildirilmiştir. Çoğu uzman *BRCA* mutasyonu taşıyan kadınlarda over ve fallop tüp kanserlerinin, adneksiyal karsinom olarak adlandırılabilen ileri sürülmektedir [37]. Kalıtsal over kanseri sendromlarının sitogenetik özellikleri ve spesifik onkolojik yolları hakkında elde edilen bilgiler, sadece daha yaygın olan sporadik over kanserlerinin patolojik ve genetik özelliklerini ve doğal öyküsünü anlamakla kalmamış, aynı zamanda belirli moleküler hedeflere yönelik ilaçların geliştirilmesine yardımcı olmuştur [2]. Genellikle kalıtsal over kanseri olan hastalarda hastalığın başlangıcı erken yaşlarda ortaya çıkar. Tanı yaşı ortalaması sporadik vakalara göre yaklaşık 8-10 yıl öncedir. Erken yaş meme ve over kanseri ile karakterize olan kalıtsal meme ve over kanser sendromu, *BRCA1* ve *BRCA2* sendromları ve kalıtsal non-polipozis kolorektal kanser (*HNPCC*) sendromlarıyla birlikte kalıtsal over kanseri sendromlarını oluşturur [38].

Şekil 2-1'de *BRCA* ve *MMR* genlerinin kalıtsal kanserlerin patogenezindeki rolleri gösterilmektedir. *BRCA1* ve *BRCA2* tümör baskılayıcı genlerin germline mutasyonlarının çoğu (%90-%95) kalıtsal over kanserinden sorumludur. Ayrıca *BRCA* mutasyonlarını taşıyan hastalarda over kanseri gelişme riski yaklaşık olarak %20-50 arasındadır [38].



Şekil 2-1: DNA onarımı ve kalıtsal kanserlerin patogenezinde *BRCA* ve *MMR* genlerinin rolü [38].

BRCA1 ve *BRCA2*, her iki gende genomik bütünlüğün korunmasında, hücre döngüsünün kontrolünde ve apoptozda birbirlerinden ayrılmaz görevlere sahiptirler. Bu genlerdeki değişiklikler nedeniyle, DNA tamiri konusunda yetersiz olan hücreler, hücre döngüsü kontrolü kaybıyla kromozom anomalilerini hücrede biriktirirler. *BRCA1* sendromu %87 oranında kadın meme kanseri gelişimiyle, %44 oranında da over kanseri gelişimi ile ilişkilidir. *BRCA2* sendromu ise %84 oranında kadın meme kanseri gelişimiyle, %7 erkek meme kanseri gelişimiyle ve %27 oranında da over kanseri gelişimiyle ilişkilidir. *BRCA* ilişkili over kanseri genellikle yüksek dereceli seröz karsinomlar olarak kendini göstermekle birlikte platin bazlı kemoterapiye daha iyi cevap vermeleri nedeniyle, ileri evre hastalığa rağmen yüksek hasta sağkalım oranları ile karakterize bir hastalıktır [39]. İnvaziv over kanseri tanısına sahip hastalarda, *BRCA* genlerinde değişikliği olanlar ile olmayan hastalar arasında hayatta kalma oranında önemli bir fark bulunmaktadır.

BRCA mutasyon taşıyıcılarında ortalama sağkalım süresi 53,4 ay iken mutasyon taşımayan hastalarda bu süre 37,8 ay olarak bulunmuştur. Her iki grup arasında 3 yıllık sağkalım oranları ise %65,8'e karşın %51,9 olarak bildirilmiştir [39, 40].

2.8.2. Lynch Sendromu

HNPCC sendromu olarak da bilinen, Lynch II sendromu kolon kanseri ve endometrial over kanseri riskini artıran otozomal dominant özellik gösteren bir hastalıktır. Lynch II sendromu genellikle DNA yanlış eşleşme tamir genleri *MLH1* ve *MSH2*'nin germline mutasyonları ile karakterizedir. Bu genlerdeki kusurlar, genomik kararsızlığa neden olarak, hücre döngüsünü ve DNA onarımını düzenleyen genlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Lynch II sendromu taşıyıcısı olan kadınlarda hayat boyu over kanser gelişme riski %12'dir. Bu nedenlerle kalıtsallık, over kanseri için en güçlü risk faktörüdür [41]. Bu genellemede, kalıtsallık terimi, yüksek penetrans ve otozomal dominant genetik yatkınlığı işaret etmektedir. Son on yılda, over kanserinin kalıtsal yatkınlığına ilişkin moleküler genetik temeller kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Ailesinde over kanseri öyküsü olan hastalar üç ana gruba ayrılmıştır. Gruplar, kalıtsal over kanser sendromu, meme ve over kanser sendromu ve kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanser (*HNPCC*) sendromu olmak üzere sınıflandırılmışlardır [42, 43]. Kalıtsal over kanser sendromu olan kadınlarda, *BRCA1* mutasyonu, *BRCA2* mutasyonlarına göre daha sık görülmektedir. Bu sendromlu hastaların aksine sporadik olarak görülen hasta grubunda ise *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları genellikle eşit frekansta görülür [44]. Tablo 2-2'de kalıtsal over kanser sendromlarının özellikleri belirtilmektedir. Bununla birlikte, son çalışmalar, *BRCA2* mutasyonlarının over kanserine katkısının ilk düşünülenenden daha fazla olduğunu göstermektedir [45-47]. *BRCA2* mutasyonları genellikle meme ve over kanseri aile hikayesi olmayan ve geç yaşlarda hastalığı ortaya çıkan kişilerde gözlemlenir. Bu hastalarda ailesel risk, aile hikayesi veya bilinen yatkınlık ile açıklanamaz, *BRCA* genleri, diğer genler veya çevresel faktörlerin etkisi over kanseri oluşumunda rol oynayabilir [48].

2.8.3. Bölgeye Özgü Over kanseri

Bölgeye özgü over kanserine yatkınlığı tek başına artıran bir gen henüz bulunamamıştır. Bu nedenle bölgeye özgü over kanseri ile kalıtsal meme ve over kanser sendromu aynı hastalık yelpazesinin bir parçası olarak kabul edilir [49].

Tablo 2-2: Kalıtsal over kanseri sendromlarının özellikleri [2]

Sendrom	Gen ve Kromozom Lokusu	Fonksiyon	Over Kanseri Alt Tipi	İlişkili Kanserler	Yaşam Boyu Over Kanseri Riski
BRCA1	<i>BRCA1</i> [17q21]	DNA Tamiri	İlerlemiş Derece Seröz Karsinom	Meme(%87), Servikal(%3,6), Rahim(%2,5), Kolon(%6,9)	% 40-50
BRCA2	<i>BRCA2</i> [13q12.3]	DNA Tamiri	İlerlemiş Derece Seröz Karsinom	Meme(%84), Erkek Meme(%7), Prostat(%7,5), Safrakesesi(1,5)	% 20-30
HNPCC	<i>MSH2</i> ; <i>MLH1</i> , -2,-6 [3p21, 2p21]	DNA Yanlış Eşleşme Tamiri	Seröz, Endometriyal Karsinom	Endometriyal(%30), kolorektal(%64), (Böbrek, Ürerta, Karaciğer) (%6)	>% 12

2.8.4. *BRCA1/BRCA2* Genleri ve Proteinleri

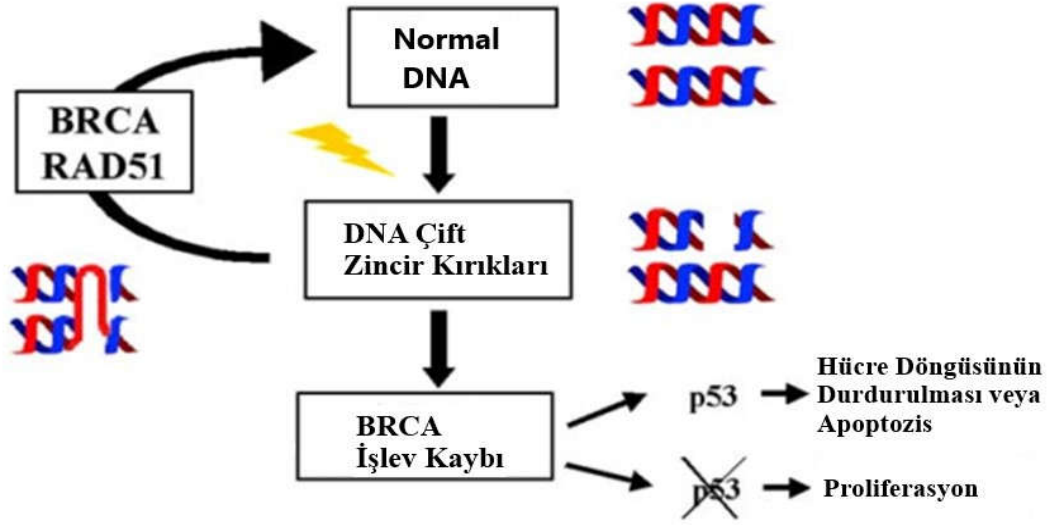
Başlıca meme ve over kanserine yatkınlık geni olarak, kromozomun 17q kolundaki *BRCA1* gen lokusu 1994 yılında tanımlandı ve klonlandı [50]. Ailesel meme kanserinin sadece %45'inde *BRCA1* geni ile ilişkili değişiklikler gözlemlendiğinden, başka meme kanseri yatkınlık genleri de olabileceği düşünüldü ve 1995 yılında meme kanseri ile ilişkili ikinci bir meme kanser lokusu bulundu ve bir yıl sonra bu gen *BRCA2* olarak isimlendirildi [51].

BRCA1 ve *BRCA2* sırasıyla 17q21 ve 13q12-13 kromozomları üzerinde bulunan tümör baskılayıcı genlerdir. *BRCA1* ve *BRCA2* birçok kodlayıcı ekzona sahip ve kodlama bölgesinin yaklaşık yarısını kapsayan büyük bir ekzon olan ekzon 11'i içeren benzer bir gen yapısına sahiptirler. Her iki protein de işlevsel olarak benzer ve yakın konumlara sahiptir [50-52]. Son on yılda, *BRCA* genlerinin yapısı ve işlevi hakkında çok şey öğrenildi. *BRCA1* ve *BRCA2* proteinlerinin, DNA hasarının bazı formlarının tanınması veya onarımı, gen ifadesinin transkripsiyonel düzenlenmesi ve hücre döngüsü kontrolü dahil olmak üzere birçok işleve katıldığı anlaşıldı. Bu işlevleri ve etkileşimdeki proteinleri Tablo 2-3'de özetlenmektedir. [53].

Tablo 2-3: *BRCA1/BRCA2* genlerinin işlevleri ve etkileşimde oldukları önemli proteinler [53]

BRCA1/BRCA2 genlerinin İşlevleri	Etkileşimdeki Proteinler
DNA Tamiri	RAD51, c-Abl
Transkripsiyon	p53, androjen reseptör, östrojen reseptör, c-Myc
Hücre Döngüsü	p53, p21

BRCA proteinleri, homolog rekombinasyon ve çift zincir DNA kırıklarının onarımında anahtar rol oynayan bir protein olan RAD51 gibi bir dizi düzenleyici protein ile etkileşime girer [54, 55]. *BRCA1* ve *BRCA2*'nin rolünün replikasyon sırasında, duraksamış replikasyon çatallında homolog rekombinasyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Hatalı homolog rekombinasyon, replikasyon hatalarına veya homolog olmayan rekombinasyona ve daha sonra genomik instabiliteye yol açabilir [56]. S fazı hücrelerinin genotoksik ajanlara maruz kalmasında sonra, *BRCA1*, *BRCA2* ve *RAD51* replikasyon bölgelerine kolokalize olurlar [56]. *BRCA1* veya *BRCA2*'nin işlevsel yokluğunda, onarım başarısız olur, bu da *TP53*'ün hücre döngüsü kontrol noktası işlevinin aktivasyonuna yol açar. Sonuç olarak hücre döngüsü durdurulur veya apoptoz gerçekleştirilir, bazen her iki durumda da hücre döngüsünün durdurulması ya da apoptozun gerçekleşmesi mümkün olmaz. Eğer *TP53* de işlevsel olarak devre dışı kaldıysa, hücreler, hücre döngüsünün durdurulması işlemine veya apoptozise uğramazlar. Hücre proliferasyonunu sürdürülerek DNA hasarının ilerleyici olarak birikmesine ve malignite sıklığının artmasına neden olur. Bu nedenle, *BRCA1* veya *BRCA2* işlevini kaybetmiş hücrelerde, tümörögenез için *TP53* yolağının da inaktivasyonu gerekli olabilir [53, 56]. Bu döngü Şekil 2-2'de gösterilmektedir.

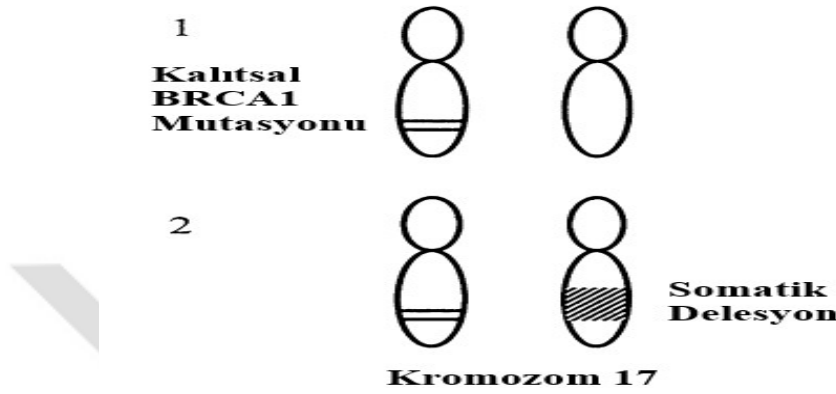


Şekil 2-2: Over kanserinde *BRCA* geninin fonksiyonunu ve fonksiyon kaybını gösteren şematik diyagram [53].

2.8.5. Kalıtsal ve Sporadik Over Kanseri

Sporadik kanserlerle karşılaştırıldığında, kalıtsal olarak *BRCA1* mutasyonunu taşıyan kadınlardan meme ve over kanserine yakalananlarda bulunan *TP53* gen mutasyonlarının sıklığı bu hipotezi desteklemektedir [57]. *BRCA1* aynı zamanda DNA onarımı, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilgili bazı genlerin transkripsiyonel bir düzenleyicisidir. Bu görevlerde rol alan *c-Myc* ve *TP53* ile etkileşimleri açıkça tanımlanmıştır [58, 59]. DNA hasarına yanıtta görev alan GADD45 ve p21^{waf1/cip1} proteinlerinin ekspresyonunun *BRCA1* tarafından arttırılmakta olduğu bildirilmiştir [60, 61]. Aynı zamanda *BRCA1* aşırı ekspresyonu östrojen reseptör transaktivasyonunu baskılamaktadır [53]. *BRCA1*, hücre farklılaşması, hücre bölünmesi, hücre adezyonu ve stres tepkisi süreçlerinde rol oynayan *c-Abl* aktivitesini düzenler. Nükleer *c-Abl*, çeşitli genotoksik ajanlar tarafından aktive edilir ve apoptozu indükler. İyonlaştırıcı radyasyona maruziyetin, *ATM*'ye bağlı *BRCA1/c-Abl* yapısal kompleksinin parçalanmasını tetiklediği, aynı zamanda *c-Abl* kinaz aktivitesinin aktivasyonu ile sonuçlandığı bulunmuştur. Bu bulgu, *BRCA1*'in, DNA onarımındaki doğrudan rolü veya hücre döngüsü kontrol noktasındaki rolünden farklı olarak başka yollarla DNA hasarına hücrel tepkileri etkileyebileceğini düşündürmektedir [54]. *BRCA* mutasyonları, erken yaş meme kanseri veya erken yaş meme/over kanserini dört ya da daha az kişide bulunduran ailelerde daha sık bulunmaktadır.

Meme ve over kanseri sendromlu hastalar, kalıtsal olarak BRCA mutasyonu taşırlar, teorik olarak ikinci allelin somatik olarak kaybı BRCA inaktivasyonuna ve karsinom gelişimine yol açar. Şekil 2-3’de meme-over kanseri sendromu ve kalıtsal mutasyonu olan bir hastada *BRCA1* tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonunu gösteren şematik diyagram bulunmaktadır.



Şekil 2-3: *BRCA1* ilişkili kalıtsal over kanseri [62].

İlk zamanlarda yapılan mutasyon çalışmalarında, tek nokta mutasyonları, küçük insersiyonlar ve delesyonlar ortaya çıkarılmıştı. Bununla birlikte, son yıllardaki araştırmalarda, *BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki yeniden düzenlemelerin, bazı popülasyonlarda tanımlanan tüm mutasyonların %10 ile %30'unu oluşturan yaygın bir mutasyon çeşidi olduğu bulunmuştur [63-67]. *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde şu ana kadar dört bini aşkın değişikliğin tayin ve tespiti yapılmış durumdadır. Her iki genin kodlama bölgesinin büyük boyutları ile birlikte mutasyonların yaygın dağılımı, mutasyon testini zorlaştırmaktadır. Bunun aksine Ashkenazi Yahudi nüfusundaki kalıtsal mutasyonların çoğunluğunu oluşturan *BRCA1* genindeki (c.185delAG, c.5382insC) ve *BRCA2* genindeki (c.6174delT) mutasyonlar %2 prevalansa sahiptir [68, 69]. Over kanserini fazla sayıda bulunduran aile bireylerinde mutasyonların genelde *BRCA2* geninin ekzon 11 bölgesinde kümelenmiş olduğu bulunmuştur ve bu bölge genellikle over kümelenme bölgesi olarak adlandırılmaktadır [70]. *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının yaklaşık % 80'i, stop kodon ve protein trunkasyonlarını neden olan çerçeve kayması veya nonsense mutasyonlardır. Bu nedenle, *BRCA* mutasyonlarının çoğunun işlevsel önemi olduğu düşünülmektedir. Meme ve over kanseri sendromu olan hastalarda, kalıtsal mutasyonların, kromozomun 17q ve 13q bölgelerindeki somatik allel kayıplarıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Böylece Knudson çift vuruş hipotezi yerine getirilmiş olmaktadır. İlk vuruş olarak belirtilen genetik değişiklik, etkilenen ebeveynden gelmekte ve bu nedenle vücudun tüm somatik hücrelerinde bulunurken, ikinci vuruş olarak belirtilen genetik değişiklik ise, ilk mutasyonu taşıyan birçok hücreden sadece birinde gerçekleşir [71]. Sporadik over tümörlerinde ise *BRCA* genlerinin mutasyonları nadir görülür. *BRCA1* ve *BRCA2* proteinlerinin işlev kaybının da kanser gelişmesinde rol oynaması mümkündür. Bu nedenle sporadik tümörlerde de *BRCA1* ve *BRCA2* lokuslarında yüksek heterozigotluk kaybı (LOH) oranları tespit edilmiştir [46, 71]. Tablo 2-4’de *BRCA1*’in over kanserindeki etkisi gösterilmektedir.

Tablo 2-4: *BRCA1* geninin ailesel ve sporadik over kanserindeki etkisi [41]

Kalıtsal Mutasyonlar ve LOH	Ailesel Over Kanseri	Sporadik Over Kanseri
BRCA1 ve BRCA2	Kalıtsal meme-over kanseri sendromunda kalıtsallıktan sorumlu tümör baskılayıcı genler olarak görev yapmaktadırlar.	Sporadik over kanserinin patogenezindeki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir.

Sporadik tümörlerde, özellikle yüksek dereceli seröz karsinomlarda *BRCA1* ekspresyonu düşük bulunmuştur [72]. Bazı vakalarda bulunan düşük ekspresyon profilleri, *BRCA1* promotör hipermetilasyonu ile ilişkilendirilmektedir [73, 74]. *BRCA1* geninin işlev bozukluğu meme ve over kanserine ek olarak, prostat ve kolon kanseri riskini de arttırmaktadır [75]. Benzer şekilde, *BRCA2* genindeki mutasyonlarda, erkek meme kanseri ve over kanseri riskine ek olarak, prostat kanseri, pankreas kanseri, safra kesesi ve safra kanalı kanseri, mide kanseri ve melanoma riskini artırmaktadır [76].

2.9. Yaşam Boyu Over Kanser Riski

Genel popülasyonda, 280 kadından 1’inin kalıtsal bir *BRCA* mutasyonu taşıdığı tahmin edilmektedir. Bu rakamın aksine, spesifik mutasyonların bulunduğu Ashkenazi Yahudi nüfusu için topluma özgü bu spesifik mutasyonlardan birini taşıma oranı 40 kadından 1’i için geçerlidir. Over kanseri olan Ashkenazi Yahudi hastalarının yaklaşık olarak %40’ında kalıtsal mutasyonları tespit edilmektedir [77].

BRCA2 mutasyonları hariç, kalıtsal *BRCA1* mutasyonları olan hastalarda over kanseri tanısında yaş ortalaması, sporadik hastalardan daha gençtir, bu yaş ortalaması kalıtsal olanlarda 54 yaş iken sporadik vakalarda 63 yaştır. Ayrıca *BRCA* genleri ile ilişkili over kanseri, genellikle 30 yaşın altındaki kadınlarda nadiren görülür [44, 78]. Bir *BRCA* mutasyon taşıyıcısında yaşam boyu tahmini over kanser riski mutasyonun bulunduğu gen bölgesine ve çalışılan nüfusa bağlı olarak %16 ile %63 arasında değişmektedir [79, 80]. Halen *BRCA1*'in ömür boyu over kanseri riski %40 ila %50 arasında olduğu düşünülürken, *BRCA2*'nin daha düşük risk taşıdığı bu oranın da %20 ila %30 arasında olduğu düşünülmektedir [77]. Bu oranlar, genel nüfusta %1,6 olarak tahmin edilen ömür boyu over kanseri riskinden önemli derecede farklılık göstermektedir [81]. Tablo 2-5'de *BRCA* genleri açısından yaşam boyu over kanser riski gösterilmektedir.

Tablo 2-5: Yaşam boyu kalıtsal ve sporadik over kanser riski [41]

Over kanseri riski	Görülme oranı(%)
<i>BRCA1</i> gen mutasyonu taşıyıcılarında	%40-50
<i>BRCA2</i> gen mutasyonu taşıyıcılarında	%20-30
Sporadik vakalarda	%1,6

Tüm bu oranların ve seçiciliğin temeli, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden dokuya özgü sinyaller olabilir. Hem genetik hem de çevresel faktörler muhtemelen over kanseri için *BRCA* gen mutasyonlarının penetrasyonunu etkilemektedir. *HRAS1*'de görülen değişken sayıdaki birbiri ardına tekrar dizileri polimorfizmler meydana getirerek, sadece *BRCA* heterozigotlarda değil aynı zamanda genel popülasyonda da over kanseri riskini artırıyor gibi görünmektedir [82]. Bir çalışmada ise, kısa androjen reseptör CAG tekrarlarının over kanseri erken teşhisi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [83].

2.10. Over Kanseri Riskini Azaltıcı Faktörler

Risk altındaki kadınlarda over kanseri insidansı oral kontraseptif kullanımı ile azaltılabilir. Östrojen ve progesteron kombinasyonu, ailesinde over kanseri öyküsü olan kadınlarda, *BRCA1* veya *BRCA2* mutasyon taşıyıcılarında ve genel popülasyonda, over kanseri riskinde azalma ile ilişkilendirilmiştir [84-86].

Yakın tarihli bir araştırmada, oral kontraseptif kullanımının, *BRCA1* ve *BRCA2* taşıyıcılarında over kanseri riskini azaltmak için planlanan profilaktik cerrahi ile aynı doğrultuda yapılması gereken bir uygulama olduğu öngörülmüştür [85]. Over kanseri ya da hem meme hem de over kanserli iki ya da daha fazla birinci ya da ikinci derece aile hikayesi olan kadınlar, doğumdan sonra ovaryum kanser insidansını azaltmak için profilaktik oofrektomiye düşünmelidir [87-89]. Çoğu cerrah, *BRCA1* ve *BRCA2* için ayrıntılı bir soyağacı ve genetik testin tamamlanmasının ardından, laparoskopi ile overlerin alınması yönünde tercih kullanmaktadırlar. Ayrıca hem fallop tüpü hem de primer peritoneal karsinom gelişme riski nedeniyle, her iki fallop tüpünün komşu peritoneumla birlikte tamamen çıkarılması önerilmektedir [90-92]. Bazı cerrahlarda fallop tüplerinin riskinin tamamen azaltmak amaçlı histerektomiye de önermektedirler [93]. *BRCA* mutasyon taşıyıcılarında bilateral salpingo-ooforektomi, fallop tüpü veya primer peritoneal kanser riskini %98, meme veya over kanseri riskini %54 azaltmaktadır [87, 88]. Profilaktik oofrektomi sonrası hormon replasman tedavisinin kullanımı, şu anda birbiriyle ilişkili birçok risk ve faydanın karmaşıklığı nedeniyle tartışmalıdır [94]. Buna karşın *BRCA* taşıyıcısı kadınların profilaktik oofrektomi sonrası 50 yaşına kadar hormon replasman tedavisi kullanmaları önerilir [95].

2.11. Monozigotik İkizler

On yıllardır, monozigotik ikizler üzerine yapılan genetik ve epidemiyolojik çalışmalar, genlerin ve çevrenin bir özellik için göreceli katkılarını ortaya koymaktadır [96]. İkizler, bir sperm tarafından döllenmiş tek bir yumurtadan oluşur ve daha sonra monozigotik veya tekil ikizler olarak adlandırılırlar. Dizigotik ikizler, iki farklı sperm tarafından döllen iki farklı yumurtadan kaynaklanır. Dolayısıyla, monozigot ikizler bir zigottan kaynaklandığından genetik olarak özdeş olarak görülürken, dizigot ikizler iki farklı zigotdan gelişmekte ve farklı genetik özelliğe sahip olan genetik varyasyonun ortalama yarısını paylaşırlar. Yakın zamana kadar, monozigot ikiz oluşum sürecinin rastgele bir prosedürü temsil ettiği düşünülmekteydi. Bununla birlikte yeni veriler, zigotun bölünme olgusuna epigenetik mekanizmaların dahil olduğunu göstermektedir [97]. Spontan olarak meydana gelen ve hayatta kalmayı başaran monozigot ikizlerde erkek cinsiyetinden çok kızlar görülmektedir.

Kız cinsiyet baskınlığı, özellikle monokoryonik diamnıyotik monozigot ikizlerde ve monokoryonik monoamnıyotik ikizlerde daha belirgindir, bunun da ikiz olma zamanlamasıyla bir ilişki içinde olduğu düşünülmektedir [98, 99].

Ayrıca maternal veya paternal X aktivasyonunun da eşleştirme sürecine katkıda bulunduğu ve kız cinsiyet hakimiyetinin gözlemlenmesinde önemli olduğu ileri sürülmüştür [99].

2.11.1. İkiz Kardeşlerle Yapılan Çalışmalar

19.yüzyılın sonlarından itibaren, ikizlerde yapılan çalışmalar genetikte önemli bir rol oynamıştır. Klasik ikiz çalışmalarında, bir hastalık için benzerlik veya monozigotik ve dizigotik ikizler arasındaki kantitatif bir özellik karşılaştırıldığında, söz konusu özellik için popülasyonda yapılan çalışmalara göre varyasyonlar dışlanmış olmakta ve buna bağlı olarak etiyolojik farkların ortaya koyulması ve görünür hale getirilmesi kolaylaşmaktadır. Kalıtsallık, ikizlerden elde edilen verilere, kantitatif genetik modellerin uydurulması yoluyla tahmin edilebilir. Bu nedenle, ikiz çalışmaların sonuçları, ikizlerin orijin aldığı tüm nüfusa uygulanabilir ve mevcut genetik bilgilere büyük katkıda bulunur. Örneğin, Kanada'da ikizlerde geniş çaplı bir çalışma yapıncaya kadar multipl skleroz (MS) genetik olmayan bir bozukluk olarak düşünülmüştür [100]. Çoğu monozigotik ikizler oldukça benzerdir ve monozigotik ikiz çiftlerin genelde konjenital malformasyonlar, kromozom anomalileri ve Mendel bozuklukları için uyumlu olması beklenir. Bununla birlikte, uyumlu olamayan ikiz çiftler üzerine yapılan çalışmalar sonucu birçok sayıda rapor yayımlanmaktadır [101]. Çok sayıda monogenetik ve kromozomal bozukluklar, farklı bireyler, kardeşler ve ikizler arasında görülebilen önemli değişkenlik ile karakterize edilir. Etkilenen kardeşler ve dizigotik ikizler ayırıcı genlerin ortalama %50'sini paylaştığından, aralarındaki fenotipik farklılıklar paylaşılmayan genetik varyasyona bağlı olabilir. Bu nedenle, monozigotik ikizlerde genetik bozuklukların değişkenliğini incelemek çok değerlidir. İnsan genetiğindeki araştırmaların önemli bir bölümü, genetik olarak belirlenen hastalıklarda değişkenlik için açıklamalar bulmaya odaklanmış ve birbirinden uyumsuz olan monozigotik ikizler bu açıdan değerli bir bilgi kaynağı olarak değerlendirilmişlerdir.

Monozigotik ikizlerde tanımlanan 22q11 delesyon sendromu, Joubert sendromu, Nörofibromatozis, Williams sendromu ve diğer birçok hastalık ile ilgili raporlardan elde edilen sonuçlar, uyuşmayan fenotiplerle, genetik olmayan faktörlerin fenotipik değişkenliği etkileyebileceğini vurgulamaktadır [102].

Fenotipik olarak uyuşmayan monozigotik ikiz çifti, bir hastalığın patogenezi anlamamıza katkıda bulunabilir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, biri prelösemik, diğeri prekürsör B hücreli akut lenfoblastik lösemi olan bir monozigotik ikiz çifti incelenerek, karsinogenezlerindeki birkaç olay arasındaki ilişki tespit edilmiştir [103]. Ayrıca, fenotipleri birbiri ile uyuşmayan monozigotik ikizler bize genetik olarak belirlenmiş bir sendromun farklı belirtilerini gösterebilirler. Süksinat dehidrogenaz alt birim B'yi kodlayan genin kalıtsal mutasyonları, kalıtsal paraganglioma ile ilişkilidir. Bir çalışmada biri paraganglioma ve diğeri mide gastrointestinal stromal tümör için ameliyat edilen monozigotik ikiz kardeşlerden bahsedilmektedir ve her ikisinin de kalıtsal süksinat dehidrogenaz gen mutasyon taşıyıcısı olduğu belirtilmektedir [104]. Birçok çalışmada kalıtsal süksinat dehidrogenaz gen mutasyonlarının gastrointestinal stromal tümörler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [105]. Sonuç olarak, aynı kalıtsal mutasyonları taşıyan monozigotik ikizler hastalıklar açısından farklı fenotipler göstermektedirler [106, 107].

2.12. MikroRNA(miRNA)

MikroRNA'ların (miRNA) varlığı ilk olarak 1993 yılında *Caenorhabditis Elegans*'ta bulunmuştur. Sonrasında ise insanlarda da bu mikroRNA'ların homologları olduğu anlaşılmıştır [108]. İlk keşfedildiklerinde gelişimde görev aldıkları belirlenen miRNA'ların aslında bugün birçok hücresel olayda faaliyet gösterdikleri anlaşılmıştır. Bu nedenle son yıllarda miRNA'ların yapı ve işlevlerini belirlemek ve hangi tiplerin hastalığa yol açtıklarının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Kodlamayan RNA'ların bir alt kümesi olan mikroRNA'lar, genellikle 19-24 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, proteine dönüştürülmeyen, hedef mRNA'ların bölünmesini post-transkripsiyonel olarak düzenlediği düşünülen veya translasyonu baskılayan RNA molekülleridir [13, 109]. Nematodlarda, sineklerde ve memelilerde miRNA'ların tüm genlerin yaklaşık %1'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir [110-112]. miRNA'ların önemi, teknolojinin ve metodolojinin sınırlı olması nedeniyle uzun süre gözden kaçırılmıştır.

Bu süreç Nematodlarda gelişim zamanlamasının kontrolü için, lin-4 ve let-7 miRNA'larının 3'UTR (kodlanmayan bölge) hedef mRNA'lara tamamlanmamış baz eşleşmesi yoluyla translasyonu baskıladığının bulunmasıyla değişmiştir [108, 113]. Bundan kısa süre sonra, Arabidopsis'de de miRNA'ların var olduğu tespit edildi ve sonuç olarak, ökaryotik evrimin erken dönemlerinde bu tür kodlamayan RNA'ların varlığı araştırılmaya başlanmıştır [114]. Bundan sonra hayvanlar, bitkiler ve hatta virüslerde de hesaplama ve deneysel yöntemlerin gelişmesiyle artan sayıda miRNA'lar tanımlanmıştır. miRNA'ların düzenleyici rolleri yalnızca gelişimsel zamanlama, hücre farklılaşması, çoğalma veya apoptozda değil aynı zamanda tümörögenез ve konakçı patojen etkileşimlerinde de tespit edilmiştir [115-118]. miRNA genlerinin, kromozomal anomaliler için kırılma bölgeleri ve sık rastlanan mutasyon bölgeleri ile sık sık çakıştığı veya tümör gelişimiyle korele olan kanser yatkınlık lokuslarının yakınında bulunduğu gösterilmiştir [12, 119, 120]. Genom üzerinde çok sayıda miRNA geni dağılmasına karşın, kümelenmiş olanlar birden fazla genin fonksiyonuyla ilişkili yani polisistronik birimler olarak ifade etkilemektedirler [112]. miRNA genleri Y kromozomu hariç bütün kromozomlara dağılmış halde bulunmaktadır. İlk zamanlar miRNA genlerinin protein kodlamayan intergenik bölgelerde bulunduğu düşünülmese de, günümüzde miRNA'lar kodlandıkları genomik bölgeye göre gruplara ayrılmışlardır. Bunlar; protein kodlayan yazılım birimlerindeki intronik miRNA'lar; içinde bulundukları genin promotorunu paylaştıkları için bu genle aynı ifade paterni gösterirler. Bir diğer grup kodlamayan yazılım birimlerindeki intronik miRNA'lar ve kodlamayan yazılım birimlerindeki ekzonik miRNA'lar; bunlar da protein kodlayan genlerde bulunan promotorlara benzer promotorlara sahiptirler [121-123]. miRNA'lar, genom materyalinin en iyi şekilde kullanılması ve işlevsel rollerin yerine getirilmesi için farklı mekanizmalardan ortaya çıkmaktadırlar. Bu da evrimin uzun yolu boyunca miRNA'ların bir resmini ortaya çıkarmaktadır. miRNA'lar diğer işlevsel RNA türlerine kıyasla birkaç farklı özelliğe sahiptir. Birincisi, bilinen miRNA'ların çoğunun polisistronik kopyalar olarak kodlanması, aynı miRNA ailesinin üyelerinin aynı anda evrimleşebileceğini ve benzer yollarla gelişebileceğini düşündürmektedir. İkincisi önemli sayıda miRNA'nın farklı organizmalar arasındaki sekanslarda yüksek oranda korunduğu ve korunan çapraz spesifik miRNA'ların uçlarında özel bir "çekirdek" dizisi bulunduğu bilinmektedir. miRNA'lar mRNA'ya bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler.

Çekirdek dizisi, miRNA'nın mRNA'ya bağlanması için şarttır. Çekirdek dizisi veya çekirdek bölgesi, çoğunlukla miRNA 5' ucunda 2-8 nükleotidlik korunmuş bir heptametrik dizidir.

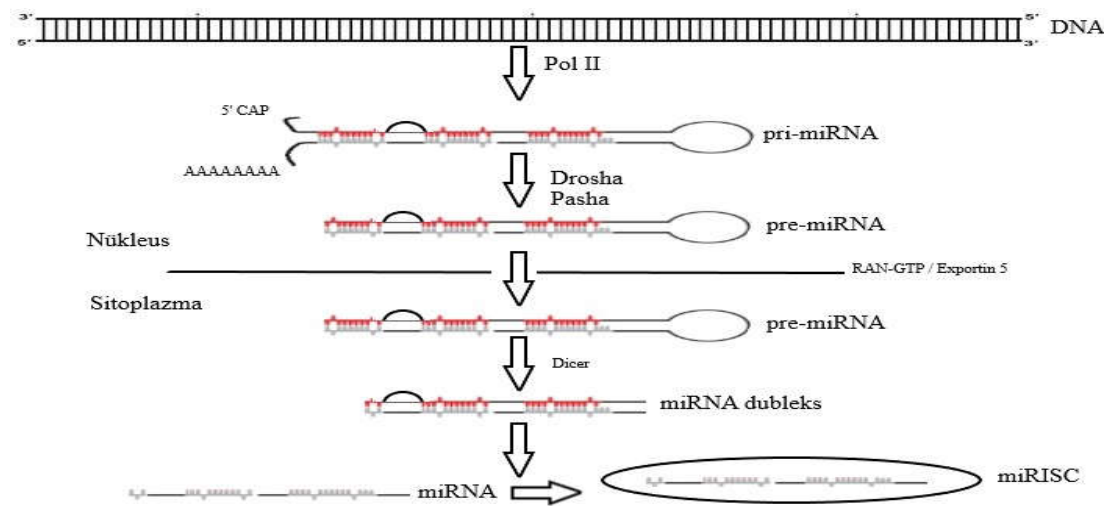
miRNA ve hedef mRNA'nın baz eşleştirmesi mükemmel olmasa da, çekirdek dizisinin tamamlayıcı olması gerekir. Böyle bir koruma, bu moleküllerin kritik hücresel süreçlere katıldığını kanıtlamaktadır [120]. Üçüncüsü miRNA'lar spesifik bir mRNA substratı yerine bir dizi mRNA'yı hedeflemekte ve regüle etme eğilimindedirler. Dördüncü olarak, deneysel kanıtlar miRNA yolağının, çok hücreli ve tek hücreli organizmaların ayrışması öncesinde gelişen eski bir düzenleyici mekanizma olduğu kavramını desteklemektedirler [124]. Son olarak da, virüsler arasındaki özelliklerde belirtilmeye değer, daha yüksek mutasyon oranları ve daha hızlı evrim süreçleri nedeniyle, çoğu viral miRNA, aynı ailenin üyeleri dahilinde bile, omurgalı muadilleriyle homolojik farklılıklar göstermektedir [117]. Homoloji eksikliği, miRNA'ların korunmuş dizilere dayalı tayini, biyologlar için zorluklar ortaya koymaktadır. Buna karşın son yıllarda yeni nesil dizileme teknolojilerinin ve diğer sistemlerin geliştirilmesiyle birlikte, çeşitli türlerden gelen miRNA'ların sayısının büyük bir hızla arttığı ve veri tabanını zenginleştirdiği göze çarpmaktadır [125-127].

2.12.1. MikroRNA'ların Oluşum Mekanizması

miRNA biyogenezi RNA Polimeraz II tarafından transkripsiyon yoluyla başlatılır. Oluşturulan birincil transkriptler (pri-miRNA'lar) genellikle birkaç kilobaz uzunluğunda olan ve hem bir 5' "CAP" ve hem de Poli(A) kuyruğuna sahiptirler. miRNA'lar öncelikle pri-miRNA olarak transkripte olurlar. Sonrasında farklı enzimlerin yardımı ile işlenir kısa sap ve ilmik yapısından oluşan pre-miRNA'ya ve son olarak da işlevsel olan olgun miRNA'ya dönüştürülürler. Bu dönüşüm aşamaları belirli moleküler mekanizmalarla gerçekleşmektedir.

pri-miRNA ilk önce ribonükleaz III ailesinin bir üyesi olan "Drosha" tarafından yaklaşık 60-80 nükleotidlik saç tokası şeklindeki pre-miRNA'ları serbest bırakmak üzere kırpılır. Drosha isimli enzim ile kesilerek pre-miRNA oluşturulur. 160 kD'luk bir nüklear Ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha yaklaşık 200 nükleotidlik pre-miRNA'nın dizilerini keserek 60-80 nükleotidlik pre-miRNA'nın oluşumunu sağlar.

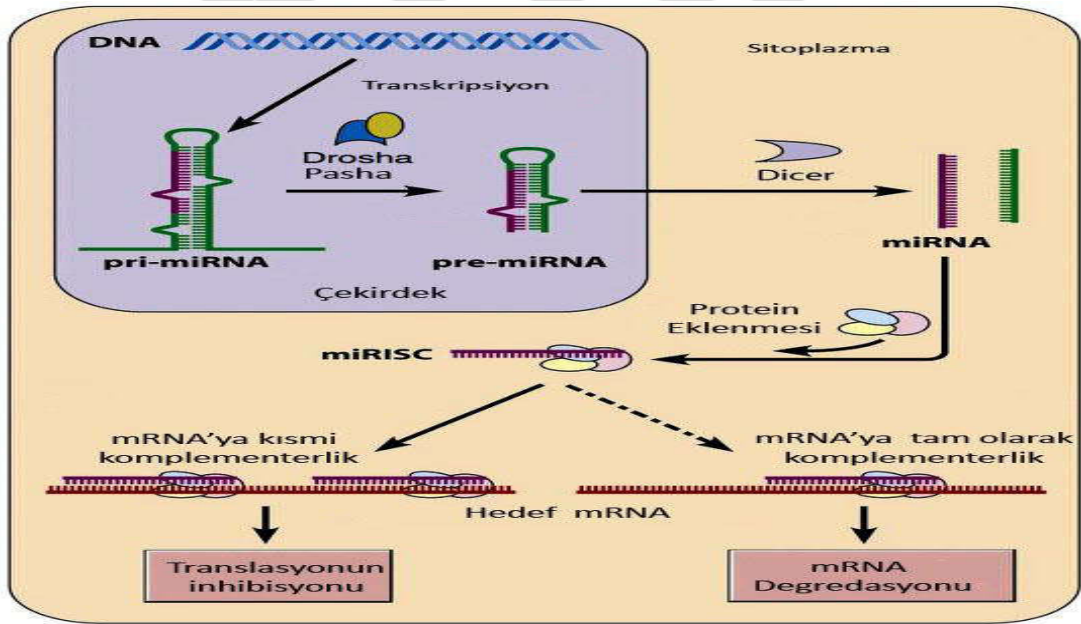
Drosha enzimi pri-miRNA'nın gövde-ilmek yapısını bularak gövdede tanınan noktadan kesme işlemini gerçekleştirir. Drosha'nın tanımadaki işlevinin özgünlüğünün, yardımcı proteinlerle sağlandığı düşünülmektedir. Bu proteinlerden "DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Gene" (DGCR8 veya Pasha) genine ait iki molekül Drosha'nın iki molekülü ile birleşerek heterotetramerik bir yapı oluşturur [128, 129]. Daha sonra Exportin-5(exp5) / ranGTP ile birleşerek pre-miRNA heterotrimerik yapı oluştururlar. Bu yapı pre-miRNA'nın yapısını koruyarak sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Sitoplazmaya ulaşıldığında RanGTP RanGDP'ye hidrolize olarak pre-miRNA'nın serbest kalması sağlanır [130]. Son olarak pre-miRNA, RNase III enzim aktivitesine sahip "Dicer" tarafından 18-22 nükleotidlik çift zincirli miRNA'ya dönüştürülür. Bu oluşum mekanizması Şekil:2-4'de gösterilmektedir. miRNA dubleksinden sadece biri, RNA-Induced Silencing Complex (RISC) kompleksine dahil olur. RISC kompleksinde bulunan ve RNaz aktivitesine sahip Argonaute'un etkisiyle dublektteki ipliklerden 5' ucu daha kararlı olan seçilir ve komplekse dahil olur. Bu iplik artık klavuz olarak kabul edilir. Diğer iplik ise anti-kılavuz iplik olarak kabul edilir ve RISC kompleksinin substratı olarak yok edilir. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif haldeki RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak ya Argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar [121, 122, 131, 132].



Şekil 2-4: miRNA'ların oluşum mekanizması [129].

DICER, RNA indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumunu başlatır. miRNA ifadesi gen susturulmasından sorumlu olup, ayrıca olgun miRNA hedef genlerin gen ifadesinde düzenleyici rol oynamaktadır [133].

miRNA'lar hedef mRNA'daki komplementer diziyi tanır. miRNA-RISC kompleksi mRNA'ya baz eşleştirme yaparak bağlanır. Böylece protein translasyonunun inhibisyonuna veya mRNA'nın yıkımına neden olur [134]. miRNA, mRNA'ya 3'UTR (3' Çevrilmeyen Bölge) bölgesinden veya ORF (Açık Okuma Alanı) denilen bölgeden bağlanmaktadır. Bu bağlanma pozisyonu miRNA'nın mRNA'ya ne oranda komplementer olma durumuna göre farklılık gösterir. 3'UTR bölgesine bağlilik tam olarak kusursuz bir komplementerlik göstermez ve sonuç olarak translasyon inhibe olur. Bu işlevsel oluşum Şekil 2-5'de gösterilmektedir. ORF bölgesine bağlanma ise tam bir komplementerlik gerektirir yani miRNA'nın mRNA bölgesine tam olarak komplementer olması gerekir ve sonuç olarak mRNA degradasyonu gerçekleşir. mRNA degradasyonu yalnızca hedef ile miRNA'nın komplementer olması sonucu oluşur, bu da bir miRNA'nın birçok mRNA'ya bağlanabileceğini ve her bir mRNA'nın birçok miRNA'ya hedef olabileceğini kanıtlanmaktadır [135-137].



Şekil 2-5: miRNA'nın işlevi [137].

2.12.2. MikroRNA'lar ve Kanser

İlk olarak gelişimde görev aldıkları belirlenen miRNA'ların bugün birçok hücresel olayda faaliyet gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedenle son yıllarda miRNA'ların yapı ve işlevlerini belirlemek ve hangi tiplerin hastalığa yol açtıklarının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma yürütülmektedir.

miRNA'ların ortaya çıkarılmasından kısa bir süre sonra bu düzenleyici moleküllerin kanserdeki rolleri de araştırılmaya başlanmıştır. İlk olarak Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında yapılmış bir çalışmada, bu hastaların yarısından fazlasında görülen 13q14 delesyonunun daha önce düşünüldüğü gibi bir “tümör baskılayıcı” geni hedeflemek yerine miRNA'ları hedeflediği gösterilmiştir [138]. miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bu ilk çalışmadan sonra buna benzer birçok çalışma yapılmış ve bilinen birçok miRNA ve bunların çoğunun kanserli hücrelerde ifade düzeyinde farklılıkların ortaya konmasına rağmen kanserdeki kesin olarak etki mekanizması açıklanan miRNA sayısı sınırlıdır [139]. Bu konuda çalışmalar yoğun şekilde sürmektedir. Bu çalışmalar ışığında kanserde etkili miRNA'lar, protein kodlayan genlerde olduğu gibi “tümör baskılayıcı” miRNA'lar ve “onkogenik” miRNA'lar olarak iki gruba ayrılmıştır [140, 141]. Çeşitli kanser türlerinde ifade düzeyi azalan bazı miRNA'ların tümör baskılayıcı miRNA'lar olduğu düşünülmüştür. İfade düzeyi azalan bu miRNA'larla fonksiyonel çalışmalar yapıldığında bunların genelde onkogenleri hedef aldıkları görülmüştür[142]. Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA'nın ifadesinin azalması onkogenlerin ifadelerinin artmasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerde olduğu gibi, tümör baskılayıcı miRNA'ları inaktive etmek için de kanserli hücrelerin çeşitli mekanizmalar kullandığı düşünülmektedir. İfade düzeyi çalışmalarında, çeşitli kanser türlerinde ifadesi azalan miRNA'lar onkogenik miRNA'lar olarak düşünülür. Bunlara “onkomir” adı verilir [143]. Birçok kanser türünde miRNA'ların ifade düzeyinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bazı miRNA'ların ifade düzeyi artarken bazılarının ki azalmıştır. Bu ifade değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar; miRNA'ların promotor bölgelerindeki metilasyon, miRNA'lardaki mutasyonlar, miRNA işlenmesinin değişmesi olarak sıralanabilir [144]. Bir miRNA'nın birçok genin transkriptini hedefliyor olması, küçük bir değişikliğin bile malign dönüşümde önemli sonuçları olacağını düşündürmektedir [145].

2.12.3. Kanserde mikroRNA aktivitesinin çeşitli mekanizmalarla bozulması

2.12.3.1. miRNA ifade düzeyinin değişmesi

Birçok kanser türünde miRNA'ların ifade düzeyinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Bazı miRNA'ların ifade düzeyi artarken bazılarının ki azalmıştır. Bu ifade değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bunlar; miRNA'ların promotor bölgelerindeki metilasyon, miRNA'lardaki mutasyonlar, miRNA işlenmesinin değişmesi olarak sıralanabilir [139].

2.12.3.2. miRNA işlenmesinin değişmesi

Olgun miRNA'ların, hedef genlerin anlatımını baskılayabilmeleri için Argonaute-2 (Ago2) proteinine yüklenip RISC kompleksini meydana getirmeleri gerekir. miRNA işlenmesinde rol alan Drosha ve RISC yapısının oluşmasında yer alan Argonaute ailesi üyesi proteinlerini etkileyen mutasyon veya ifade değişimleri de olgun miRNA oluşmasını ve RISC kompleksinin görevini yerine getirmesini engeller. Bu nedenle bazı kanser türlerinde bu komplekste yer alan kodlayan genlerin mutasyonlarının da moleküler patogeneze rol oynadığı gösterilmiştir [146, 147].

2.12.3.3. miRNA: mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar

Bu mutasyonlar miRNA'lardaki mutasyonlar ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki mutasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. mRNA'nın 3'UTR kısmındaki mutasyonlar, ya miRNA'nın bağlanmasını azaltabilir veya arttırabilir ya da miRNA'lar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir [148].

2.12.3.4. miRNA'larda mutasyonlar

Birçok kanser türünde kansere yakalanan bireyler için aile öyküsü bulunduğu halde, bu durumdan sorumlu kalıtsal mutasyonları taşıyan genler sadece belli kanserler için tanımlanabilmiştir. miRNA'ların kanserde oynadıkları rol göz önünde bulundurulduğunda bu miRNA'ları kodlayan genlerdeki mutasyonların da protein kodlayan genlerde olduğu gibi ailesel kanserlerde yatkınlık etkisi veya kanser oluşumunda etkisi olabileceği düşünülebilir [149]. Bu mutasyonlar ya olgun miRNA'nın yapısını değiştirerek hedef transkripti ile eşleşmesini değiştirebilir ya da pri-miRNA veya pre-miRNA'daki mutasyonlar ile miRNA'nın işlenmesini etkileyebilir. Pri-miRNA'nın promotor bölgesindeki mutasyonlar ise transkripsiyon oranını değiştirebilir [148].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

08.01.2016 tarih ve 01 sayılı Etik Kurul kararı ile İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmesinin uygun olduğu onayını alan çalışmada, 2012 yılında İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü Genetik Polikliniği'ne başvurmuş olan yüksek riskli over kanser ailesine mensup erken yaş over kanser tanılı hasta ile sağlıklı monozigotik ikiz kardeşi ve hastanın kızı, 2 ablası, 1 kız kardeşi, 1 yeğeni ile 1 erkek kardeşi olmak üzere toplam 8 vakaya ait periferik kan örneklerinden ayrıştırılmış lenfosit hücreleri kullanılmıştır. Her bir kişi çalışma konusu hakkında bilgilendirilmiş ve gönüllü onay formu imzalatıldıktan sonra çalışmaya alınmıştır. Çalışmada yüksek riskli aileye mensup ve çalışmaya katılmayı kabul eden aile fertlerinin rutin tetkik için verdikleri periferik kan örnekleri kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Kitler

Kullanılan kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlelere ait bilgi ve detaylar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3-1: Kimyasal maddeler, malzemeler ve kitlelere ait bilgiler

Biocoll Separating Solution (Ficoll) [BIOCHROM]
β -Merkaptoetanol, Tris (hidroksimetil aminometan), Borik Asit [MERCK]
Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavisi (BFB) [SIGMA]
Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA)
Lysis Buffer ve Buffer R.
miRNeasy Mini Kiti [QIAGEN] ve QIAzol Lysis Reagent [QIAGEN]
Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Agilent miRNA Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Slayt koruyucu (Ozon bariyer) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Gasket slayt (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Chamber (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlara ait bilgi ve detaylar aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan cihazlar ve detayları

-80 Derin Dondurucu [SANYO]
Azot Tankları [MVY]
Yüksek Hızlı Soğutmalı Santrifüj [HERAEUS]
Soğutmalı Eppendorf Santrifüj [HERAEUS]
Santrifüjler Soğutmasız [HETTICH, JOUAN]
Mikropipetler [GILSON]
Yatay Gel Elektroforez Tankları ve Jel Dökme Sistemleri [BRL]
Vorteks [FINEPZR]
Distile Su Cihazı [MILLIPORE]
Spektrofotometre NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC]
Gel Dökümantasyon Sistemi [BRL]
Etüvler (37°C ve 56°C) [NÜVE]
Manyetik Karıştırıcı [NUVE]
Vortex Mixer IKA-Model MS3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Chip Priming Station (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)
Agilent Microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD)

3.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

BFB Yükleme Tamponu, PBS Tampon Çözeltisi, TEB Tampon Çözeltisi, 1,5'lik Agaroz, Lysis Buffer, Buffer R. ve Bilgisayar Programları kullanılmış ve aşağıdaki tabloda belirtildiği üzere hazırlanmıştır.

Tablo 3-3: Kullanılan tampon, çözelti içerikleri ve bilgisayar programları

<u>10X BFB Yükleme Tamponu (2mL)</u>	
•	%1 SDS
•	5mg Brom fenol Mavisi
•	2mL Gliserol

<u>10X PBS Tampon Çözeltisi (1L)</u>
• 80 g NaCl
• 2 g KCl
• 11,5 g Na ₂ HPO ₄
• 2 g KH ₂ PO ₄
<u>10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi (1L)</u>
• 0.88 M Borik Asit
• 5 M Tris
• 0.02 M EDTA (pH: 8.00)
<u>%1,5'lik Agaroz Hazırlanması</u>
• 1,5 g Agaroz
• 100mL 0.5X TEB
• 5µL Etidyum Bromür (10mg/mL)
<u>1X Lysis Buffer (100mL)</u>
• 10 mL 10 X Lysis Buffer (ABM)
• 90 mL distile su
<u>Buffer R.(100mL)</u>
• 49 mL PBS
• 2 mL FBS
• 50 µL EDTA
<u>Bilgisayar Programları</u>
Agilent Technologies 2100 Expert Software
Agilent Feature Extraction 11.0 (Agilent Technologies, CA, ABD)
IBM Support SPSS 21.0

3.4. Deney Yöntemleri

3.4.1. Periferik Kandan Lenfosit İzolasyonu

- EDTA'lı tüpe alınmış 10 mL kan 1/1 oranında %0.9'luk NaCl ile dilüe edildi.
- Dilüe edilmiş kan örneği 2 mL Ficoll üzerine yavaş yavaş pipet yardımıyla eklendi. 2000 RPM 'de 30 dk. süreyle santrifüj edildi.
- Orta fazda bulunan beyaz kan hücreleri (lenfositler) pastör pipet yardımıyla temiz bir tüpte toplandı.
- 2000 RPM 'de, 24°C oda sıcaklığında, 10 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülerek pellet üzerine 4 mL PBS eklendi ve pellet pipetlenerek çözüldü. Çözölmüş pellet 4 krio tüpe 1'er mL olacak şekilde dağıtıldı.
- Krio tüpler 2000 RPM 'de, 24°C oda sıcaklığında, 5 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant döküldü. Elde edilen hücreler -80°C'de 1 gün süreyle inkübe edildi.
- Daha sonra Krio tüplerdeki hücreler uzun süreli saklanmak üzere sıvı azotlu hücre saklama tankına aktarıldı.

3.4.2. miRNA İzolasyonu

Elde edilen lenfosit örneklerinden miRNA izolasyon işlemi miRNA'ya özel olan miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak ve kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Protokole göre işlem basamakları;

- Azot tankında saklanan hücreler üzerine 700 µL QIAzol solüsyonu eklendi.
- Vorteks yardımıyla karıştırılarak hücrelerin parçalanmaları sağlandı.
- Nükleoproteinlerin tamamen parçalanması için 5 dakika, 24°C oda sıcaklığında bekletildi.
- Üzerlerine 140 µL kloroform eklenerek 15 saniye boyunca elde çalkalanarak karıştırıldı.
- 2-3 dakika 24°C oda sıcaklığında inkübe edilen tüpler +4°C'de 12.000g'de, 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda oluşan üst faz pipet yardımıyla alınarak toplama tüpüne aktarıldı. Üzerine 525 µL %100 Etanol eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı.

- Elde edilen karışımdan 700 μ L alınarak, 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy MiniElute spin kolona aktarıldı.
- Tüpler 24°C oda sıcaklığında 8000g'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi.
- Spin kolonlara 700 μ L RWT tamponu eklenerek, 8000g'de 15 saniye santrifüj edilmek suretiyle kolonlar yıkandı.
- Kolonlara iki kez üst üste 500 μ L RPE tamponu eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı.
- 2 mL'lik temiz tüplere yerleştirilen kolonlar maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilmek suretiyle kurutuldu.
- 1.5 mL'lik steril tüplere yerleştirilen kolonlar, 50 μ L saf su eklenerek 8000g'de 1 dakika santrifüj edilerek miRNA'lar toplandı.

3.4.3. miRNA'ların Saflık ve Konsantrasyon Analizleri

Öncelikle miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) kullanılarak izole edilen miRNA'ların varlığı ve kalitesi % 1.5 Agaroz jelde 150V'da elektroforez edilerek incelendi. Ardından miRNA'ların saflık ve konsantrasyon analizi "Thermo Scientific NanoDrop 2000" cihazı kullanılarak yapıldı.

- miRNA'ların 1 μ L'si Nanodrop cihazında ölçüldü.
- Nanodrop cihazı ölçüm sonucuna göre her kişiye ait miRNA'ların saflığı, spektrofotometrik olarak 260nm ve 280nm dalga boylarındaki ölçümlerin karşılaştırılmasıyla elde edildi.
- 260/280nm dalga boylarındaki ölçüm oranı, örneklerin saflığının bir kalite göstergesi olup tüm RNA ölçümleri için ideal değer aralığı 1,8 ila 2,2 arasında olan örnekler çalışmaya dahil edildi.

İzole edilen miRNA'ların ikinci bir uygulama ile validasyonu ise Biyoanalizör cihazında miRNA kalite kontrolü ve konsantrasyon ölçümü için kullanılan "Agilent RNA 6000 Nano Kit" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) ile Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Biyoanalizör ölçümü öncesi jel ve boya karışımı hazırlandı.

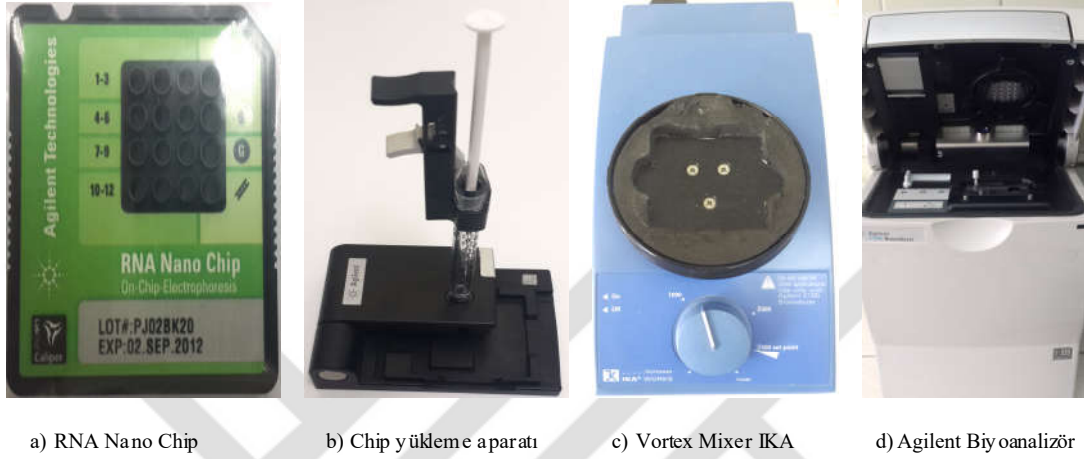
Bu aşamanın ardından Chip'in hazırlanması, örnek ve ladder'ın Chip'e yüklenmesi, ölçüm işlemi, ölçümün değerlendirilmesi ve analizi işlemleri gerçekleştirildi.

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 propenal 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 vortekslelendikten 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 μ L jel boya karışımı ilave edildi.
- Jel boya karışımını içeren G kuyuları hariç diğer ladder ve örnek kuyularına, 5'er μ L Agilent RNA 6000 markerdan yüklendi.
- Ladder kuyucuğuna 1 μ L Agilent RNA 6000 Ladder, diğer örnek kuyucuklarında elde ettiğimiz RNA örneklerinden 1'er μ L 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 propenal 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/μL ile rRNA oranı 1'in üzerinde olup RNA Integrity Number (RIN) değerleri 7-9 arasında bulunan örnekler array uygulaması için uygun örnekler olarak değerlendirildi.



Şekil 3-1: “Agilent 2100 Biyoanalizör” uygulamasında kullanılan araçlar.

3.4.4. MikroArray Protokolü

MikroArray protokolüne, 100 ng total RNA ile başlandı. Total RNA miRNA Spike-in kit kullanılarak, işaretlendi ve miRNA'ların hibridizasyonu sağlanarak sonuçların okunmasına hazır hale getirildi. Çalışmada 2 farklı spike-in solüsyonu hazırlanarak deneyin kalite-kontrolü ve biyolojik verinin ayırt edilmesi sağladı. Labeling spike-in solüsyonu işaretleme aşamasında, hibridizasyon spike-in solüsyonu ise hibridizasyon aşamasında kullanıldı.

3.4.4.1. Spike-in Solüsyonu hazırlanması

- Tüm miRNA Spike-in kit içeriği çözüldü ve vortekslendi.
- Kısa bir santrifüj ile solüsyon içeriği çöktürüldü.
- Labeling Spike-in ve hibridizasyon spike-in solüsyonlarından seri dilüsyon yapıldı.
- Her iki solüsyon için ayrı tüpler hazırlandı. Her tüpe 198 μL seyreltme tamponu eklendi. İşaretleme için her bir tüpteki tampon çözelti üstüne Labeling-Spike-in ve Hibridizasyon-Spike-in solüsyonlarından 2'şer μL ilave edildi. Karışım çok iyi vortekslendi ve santrifüj edildi.

- Her bir Spike-in solüsyonuna iki seri dilüsyon uygulandı ve her bir solüsyonun ikinci ve üçüncü dilüsyonları kullanıma hazır hale getirildi.
- Çalışmada Spike-in solüsyonların birinci dilüsyonları stok olarak -80°C’de saklandı. Her bir çalışmada solüsyonların üçüncü dilüsyonu kullanıldı. Her çalışma öncesi üçüncü dilüsyon, stok olarak saklanan birinci dilüsyondan taze olarak hazırlandı. Çalışma süresi boyunca Spike-in solüsyonlarının ilk dilüsyonlarına iki kereden fazla dondurma-çözme işlemi uygulanmadı.

3.4.4.2. Örnek İşaretlenmesi ve Hibridizasyon

100 ng total RNA’da var olan miRNA’lar miRNA Labeling ve Hyb Kit” kullanılarak floresan olarak işaretlendi. İşaretleme işleminde floresan boya olan Cyanine 3-pCp molekülü RNA’nın 3’ ucuna %90’ın üzerinde verimlilik ile bağlanır. İşaretleme işlemi, RNA’nın defosforilasyon, denatürasyon ve Cyanine 3-pCp ligasyon aşamalarını içerir. Daha sonra işaretli RNA, kolon veya kurutma-uçurma yöntemiyle purifiye edilerek DMSO ve bağlanmamış olan Cyanine 3-pCp molekülleri uzaklaştırıldı. İşaretlenmiş miRNA’lar bloklama ve Hyb spike-in solüsyonu ile muamele edildi. Ardından işaretli miRNA’ların hibridizasyon chamber içerisinde slide’lara bağlanma işlemi gerçekleştirildi. Yıkama ile bağlanmayan moleküller uzaklaştırıldı. Bu işlemin ardından miRNA’ların bulunduğu slide okuma işlemi için hazır hale getirildi.

3.4.4.3. Örnek defosforilasyonu

- İzole edilen RNA örnekleri 50 ng/μL olacak şekilde DNase/RNase içermeyen distile su ile dilüe edildi.
- Her bir dilüe RNA örneğinden 2 μL(100ng) alınarak 1,5 mL’lik eppendorf tüpe aktarıldı. İşlem buz içinde gerçekleştirildi.
- Her bir örnek üzerine 2 μL “CIP Master Mix” karışımı ilave edildi ve 4 μL olan son hacim yavaşça pipetlenerek karıştırıldı.
- Karıştırılmış olan 4 μL son hacimdeki örnek 37°C’de su banyosunda 30 dakika inkübe edildi ve örneğin defosforilasyonu sağlandı.

Tablo 3-4: “CIP Master Mix” hazırlanması

Her bir örnek için;

0.4 µL 10X Calf Intestinal Phosphatase Buffer
1.1 µL Labeling Spike-in solüsyonu
0.5 µL Calf Intestinal Phosphatase

3.4.4.4. Örnek Denatürasyonu

- Defosforile edilen miRNA’ların nonspesifik katlanmalarını önlemek için her bir örneğe 2.8 µL DMSO(dimetilsülfoksit) ilave edildi.
- Örnekler 100°C’de su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından tüm örnekler içinde buz bulunan soğuk su banyosuna transfer edildi.

3.4.4.5. Örnek Ligasyonu

- Ligasyon işlemi için 10x T4 RNA Ligaz enzimi kullanıldı. Enzim 37°C’de vortekslenerek tamamen çözündü.
- Her bir örnek üzerine 4.5 µL “Ligation Master Mix” karışımı ilave edildi ve 11.3 µL yaklaşan son hacim yavaşça pipetlenerek karıştırıldı.
- “Ligation Master Mix” karışımı üç farklı reaktifin karıştırılmasıyla hazırlandı.

Tablo 3-5: “Ligation Master Mix” hazırlanması

Her bir örnek için;

1 µL “10X T4 RNA Ligase Buffer”
3 µL “Cyanine 3-pCp” boyası
0.5 µL “T4 RNA ligase” enzimi

- Ligasyon örnek karışımı 16°C’de 2 saat inkübe edildi.
- Karışım 50°C’de vakumlu liyofilizatörde 2 saat boyunca kurutuldu.
- Ardından örnekler 18 µL DNaz ve RNaz içermeyen su ilave edildi ve örnekler çözülerek hibridizasyon işlemine hazır hale getirildi.

3.4.4.6. Örneklerin Hibridizasyonu ve Slaytlara Yüklenmesi

- İlk olarak Hibridizasyon karışımı bileşenlerinden “10x Blocking Agent” hazırlandı.
- “miRNA Complete Labeling and Hyb” kiti içeriğinde liyofilize olarak bulunan 10x Blocking Agent” reaktife 125 µL DNaz ve RNaz içermeyen su ilave edildi.
- Karışım vorteks yardımıyla karıştırıldı ve 37°C’de su banyosunda 5 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra her bir reaksiyon için hibridizasyon karışımı hazırlandı. Her bir reaksiyon için tüplere, işaretlenmiş miRNA örneğinden 17 µL, “Hibridizasyon Spike-in” solüsyonundan 1 µL, hazırlanan “10X Gene Expression Blocking Agent” karışımından 4.5 µL, “2x Hi-RPM Hibridizasyon” tamponundan da 22.5 µL olmak üzere ilave edilerek toplam hacmi 45 µL olan hibridizasyon karışımı elde edildi.
- Karışım 100°C’de su banyosunda 5 dakika inkübe edildi, daha sonra karışım bekletilmeden içinde buz olan soğuk su banyosuna transfer edilerek 5 dakika soğuk su banyosunda bekletildi.

3.4.4.7. Hibridizasyon Düzeneklerinin hazırlanması

- Öncelikle lastikli lamlar lam tutucuya yerleştirildi. Lastikli lam etiketi yukarıya bakacak şekilde, lam tutucu hazne tabanı ile hizalandı (Şekil 3-2).
- Lam tutucu hazne tabanı ile lastikli lamın 8 kuyucuğunun aynı hizada olduğundan ve aralıksız olduğundan emin olunduktan sonra lastikli lam, lam tutucuya yerleştirildi.
- Hibridizasyon karışımı 45 µL örnekler, sekiz kuyucuğun her birine yüklendi.
- Daha sonra miRNA problemlerini içeren cam lam paralel olarak lastik lam ile hizalandı. Agilent etiketli barkod aşağıya, nümerik barkod ise yukarıya bakacak şekilde yerleştirildi. Lam tutucu üzerindeki kelepçeler sıkıştırılarak kapatıldı.
- Kuyucuklar içindeki örneklerin lam üzerindeki hareketliliği kontrol edildikten sonra birleştirilen haznenin, 55°C’de 20 RPM’de 20 saat inkübasyonu ile hibridizasyon sağlandı.

3.4.4.8. Yıkama ve Slaytların Taranması

- Yıkama işlemi için “Gene Expression Wash Buffer 2” yıkama solüsyonu 37°C'de bir gece boyunca etüvde inkübe edildi.
- Mikroarray slaytları, problemleri içeren lamın birleştirilen hazneden ayrımı için “Gene Expression Wash Buffer 1” tamponuna aktarıldı. Prob lamı ve plastik lamın ayrımı bu aşamada sağlandı.
- Slaytlar, oda sıcaklığında “Gene Expression Wash Buffer 1” tampon çözeltisi içerisinde 5 dakika süre ile çalkalandı ve ardından kurutuldu.
- İkinci yıkamada ise slaytlar bu sefer 37°C'de “Gene Expression Wash Buffer 2” tampon çözeltisi içerisinde 5 dakika süre ile inkübe edildi ve kurutuldu.
- Yıkama işlemleri tamamlanarak kurutulan miRNA Prob slaytı, lam tutucu aparata yerleştirildi.
- Slaytların taranma işlemi Agilent Microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) cihazında gerçekleştirildi (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: MikroArray uygulamasında kullanılan araçlar.

3.4.4.9. Veri Analizi ve Örnekleri Değerlendirme

- Slaytların taranması SurePrint G3 Human miRNA Microarray, Release 21.0, 8x60K (Agilent, Inc. Santa Clara, CA) platformunda ve Agilent Technologies G2600D tarama protokolü kullanılarak yapıldı.

- Tarama işlemi sonrası elde edilen “tiff”(Tagged Image File Format) uzantılı dosyaların analizi Agilent Feature Extraction v11.0.1.1 programı kullanılarak gerçekleştirildi.
- Bu analiz programı ile örneklerin ve koşumun kalitesi, tüm deney koşumunda gerçekleşen aşamaların başarı seviyeleri tespit edildi ve biyoinformatik analize geçildi.

3.4.4.10. Biyoinformatik analizler

- Ham verinin işlenme aşaması logaritmik analiz, threshold, normalizasyon, korelasyon, mean ve median değerleri hesaplandı.
- Ardından, karşılaştırılan örnekler arasında farklı ekspresyon profili gösteren miRNA’lar filtrelendirildi.
- Örneklerin ekspresyon seviyelerindeki değişimin kat oranını belirten “Fold&Change”(FC) oranları ve istatistiksel “Independent-Samples T-Test” kullanılarak, belirlenen gruplar arasında ortalamalar açısından fark olup olmadığını araştırıldı. Cut-off değerleri Fold&Change oranları $|FC| \geq 2$ ve p değeri < 0.05 olarak alındı.
- Hiyerarşik kümeleme analizi Euclidean metodu, Complete Linkage kümeleme metotları kullanılarak yapıldı.
- Deneysel hataların kontrol edilmesi ve yanlış bulgu oranının tespiti Hochberg analizi ile belirlendi.

4. BULGULAR

Çalışmaya yüksek riskli over kanser ailesine mensup toplam 8 kişiden oluşan aile fertleri dahil edildi. Çalışmanın başlangıcında yüksek riskli bu ailede *BRCA1* ve *BRCA2* genlerine ilişkin mutasyonlar araştırıldı. Yüksek riskli bu ailede hastalığın *BRCA1* geninin 20.ekzonun'da bulunan c.5266dupC p.Gln1756Profs*74 rs397507247 mutasyonu ile ortaya çıktığı saptandı. Aile fertlerinden erken yaş over kanser tanılı monozigotik hasta ile sağlıklı monozigotik ikiz kardeşi, sağlıklı 3 kız kardeşi ve 1 yeğeni olmak üzere toplam 6 kişinin ailede var olan *BRCA1* gen mutasyon taşıyıcısı oldukları, monozigotik ikizi olan over kanser hastasının kızı ile erkek kardeşi olmak üzere toplam 2 kişinin de ailedeki *BRCA1* gen mutasyonunu taşımadığı yani ailedeki mutasyon açısından negatif olduğu belirlendi. Çalışmada mutasyon taşıyıcı olan ve olmayan, over kanser tanısı alan ve almayan vakalarda tüm genom düzeyinde miRNA incelemesi yapıldı ve gruplar arasında farklılık gösteren miRNA'lar belirlendi. Gruplar arasında farklılık gösteren miRNA'ların over kanser etiyolojisi, *BRCA1* mutasyon taşıyıcılığı ve over kanserine yatkınlığı ile ilişkileri değerlendirildi. Tüm bulgular biyoinformatik analiz sonucu çıkan değerlendirmelerden oluşmaktadır. Tez çalışması süresince yapılan veri analizi değerlendirme sonuçları sırasıyla aşağıda sunulmuştur.

4.1. Biyolojik Materyalin Kalite Kontrol Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılacak biyolojik materyallerin kalite kontrol analizi “Nanodrop 2000” ve “Agilent Biyoanalizör” cihaz ölçümleri ile yapıldı. Nanodrop cihazı ile yapılan örnekler için ölçüm değerleri Tablo 4-1’de, Biyoanalizör cihazı ile yapılan ölçümler ise Tablo 4-2’de görülmektedir.

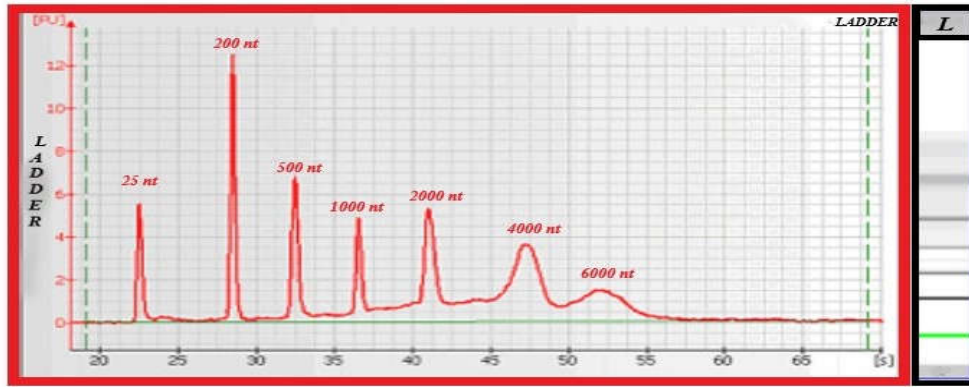
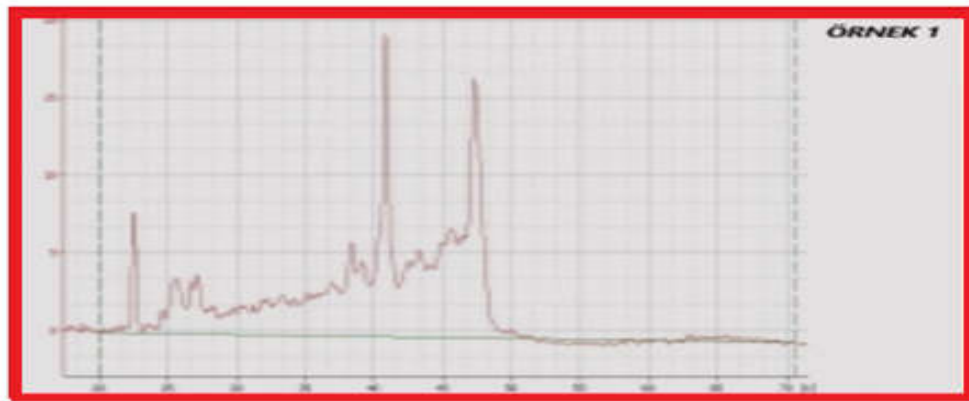
Tablo 4-1: Örnekler için Nanodrop ölçüm değerleri

Örnekler	Nükleik Asit Kons.	Birim	A260/A280	A260/A230	Numune
1	196,5	ng/ µL	2,13	1,97	RNA
2	110,8	ng/ µL	2,09	1,88	RNA
3	132,6	ng/ µL	2,07	1,76	RNA
4	176,1	ng/ µL	1,99	2,09	RNA
5	258,3	ng/ µL	2	2,14	RNA
6	141	ng/ µL	2,03	2,03	RNA
7	112,6	ng/ µL	2,05	1,88	RNA
8	233,7	ng/ µL	1,98	2,05	RNA

Tablo 4-2: Örneklerle ait Biyoanalizör ölçüm değerleri

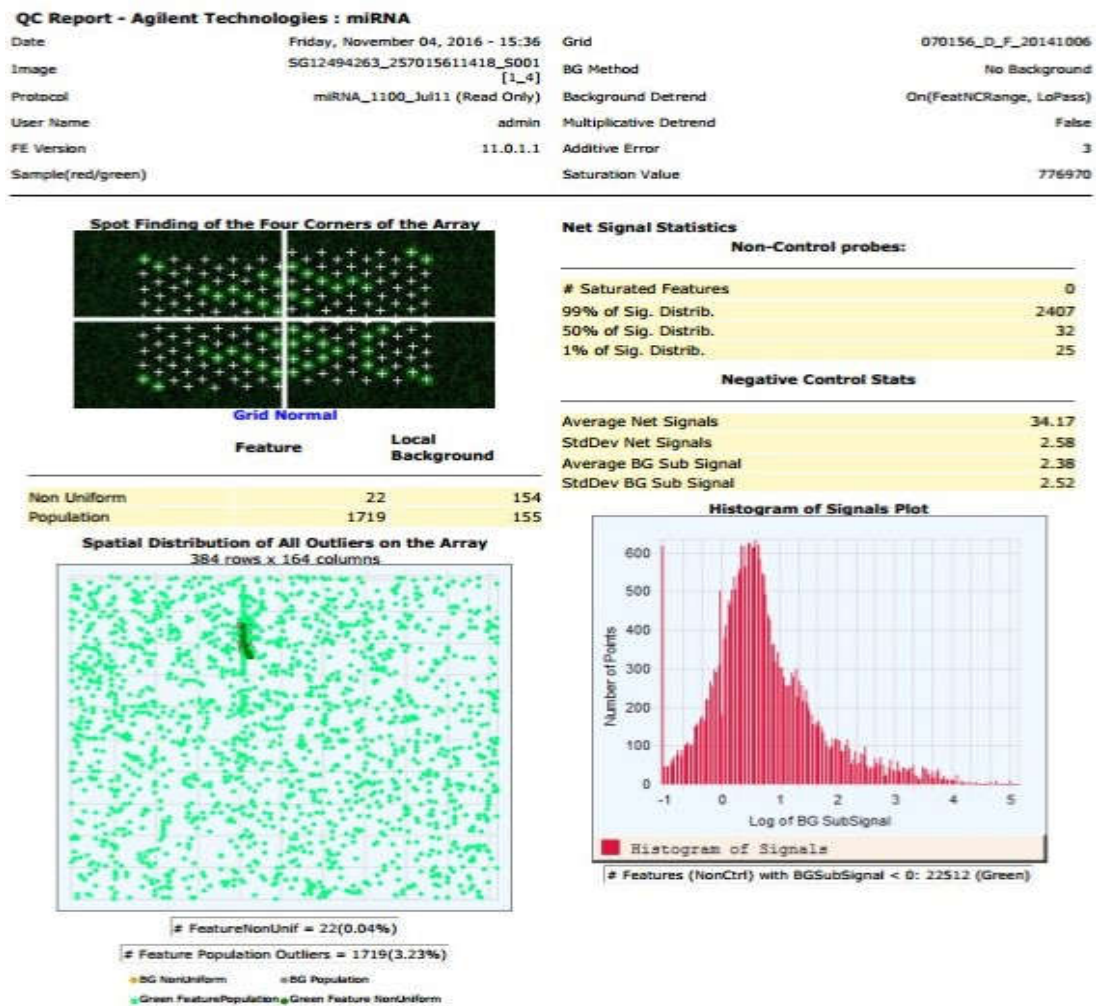
Örnekler	Nükleik Asit Kons.	Birim	A260/A280	A260/A230	Numune	rRNA Oranı	RIN
1	221,4	ng/μL	2,06	2,04	RNA	1,8	7,4
2	124,2	ng/μL	2,08	1,84	RNA	2	7,9
3	141,7	ng/μL	2,08	1,99	RNA	1,8	7,5
4	194,4	ng/μL	1,9	1,99	RNA	1,7	7,2
5	284,1	ng/μL	1,96	2,14	RNA	1,8	7,8
6	167,1	ng/μL	1,97	2,11	RNA	2,2	8,1
7	129,2	ng/μL	1,98	2,13	RNA	2,1	8
8	256,1	ng/μL	2,06	2,09	RNA	1,8	7,7

Biyoanalizör cihazında biyolojik materyalin ölçümünde kullanılan marker ve bir vakaya ait biyolojik materyalin biyoanalizör elektroferogramı sırasıyla Şekil 4-1 ve 4-2’de verilmiştir.

**Şekil 4-1: Marker'a ait Biyoanalizör elektroferogramı.****Şekil 4-2: Örneğe ait Biyoanalizör elektroferogramı.**

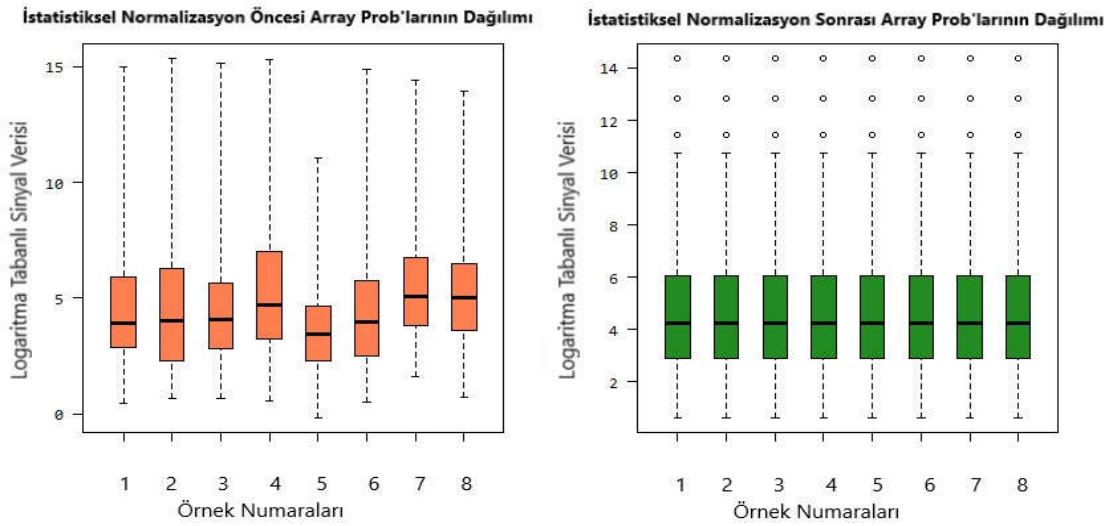
4.2. MikroArray Aşamalarının Kontrolü ve Değerlendirilmesi

Kalite kontrollerinden emin olunan örnekler, Agilent Microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) cihazında SurePrint G3 Human miRNA Microarray, Release 21.0, 8x60K (Agilent, Inc. Santa Clara, CA) platformunda ve Agilent Technologies G2600D tarama protokolü kullanılarak tarandı. Her bir örnek için tek tek Agilent Feature Extraction v11.0.1.1 programı kullanılarak, örneklerin kalite kontrol incelemeleri için “QC report” dosyaları incelenerek uygun mikroarray verileri değerlendirildi. Şekil 4-3’de bir örneğe ait QC report dosyası ve değerlendirilmesine ilişkin aşamalar görülmektedir. Bu verilerde problemlerin hangi oranda doğru bağlandığı ve bağlanma yoğunluklarının doğrulukları saptandı.

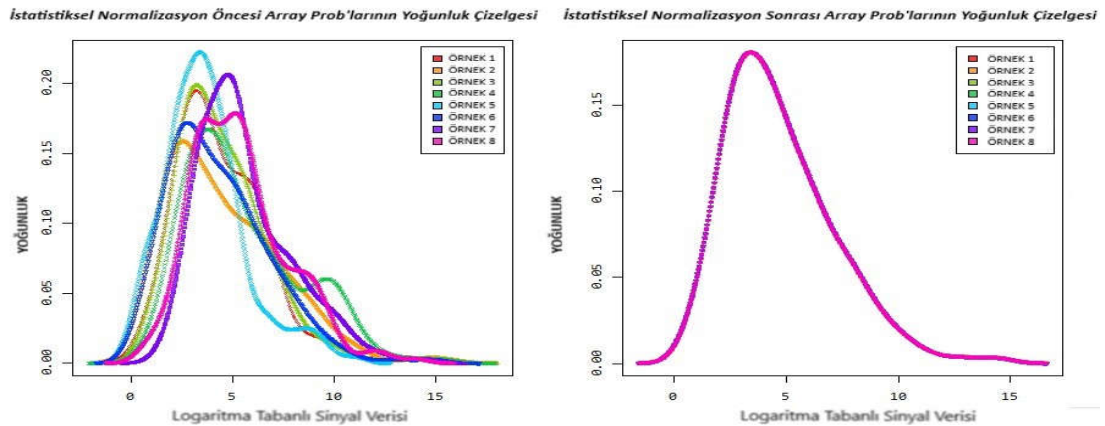


Şekil 4-3: Örneklere ait “QC Report” değerlendirilme sonuçları.

“QC Report” ’değerlendirme aşamasından sonra cihazdan alınan ham verilerin filtreleme ve normalizasyon işlemleri (her bir örnek için ortalama değerlerin dışında kalan veriler ayrıştırıldı) yapıldı. Bu işlemde mikroarray problemlerinin her bir örneğe ait bağlanma sayısı ve yoğunluğu değerlendirildi. Bağlanma oranları birbirlerine yakın örneklerin normalize edilmesine ilişkin veriler alındı. Şekil 4-4’de normalizasyon öncesi ve sonrası mikroarray problemlerinin logaritma tabanlı sinyal verilerinin istatistiksel dağılımları görülmektedir. Şekil 4-5’de ise mikroarray problemlerinin normalizasyon öncesi ve sonrası her bir örnek başına bağlanma yoğunluklarının istatistiksel logaritmik değerleri verilmektedir. Böylece normalize edilen örneklerin veri analizi aşamasına geçildi.

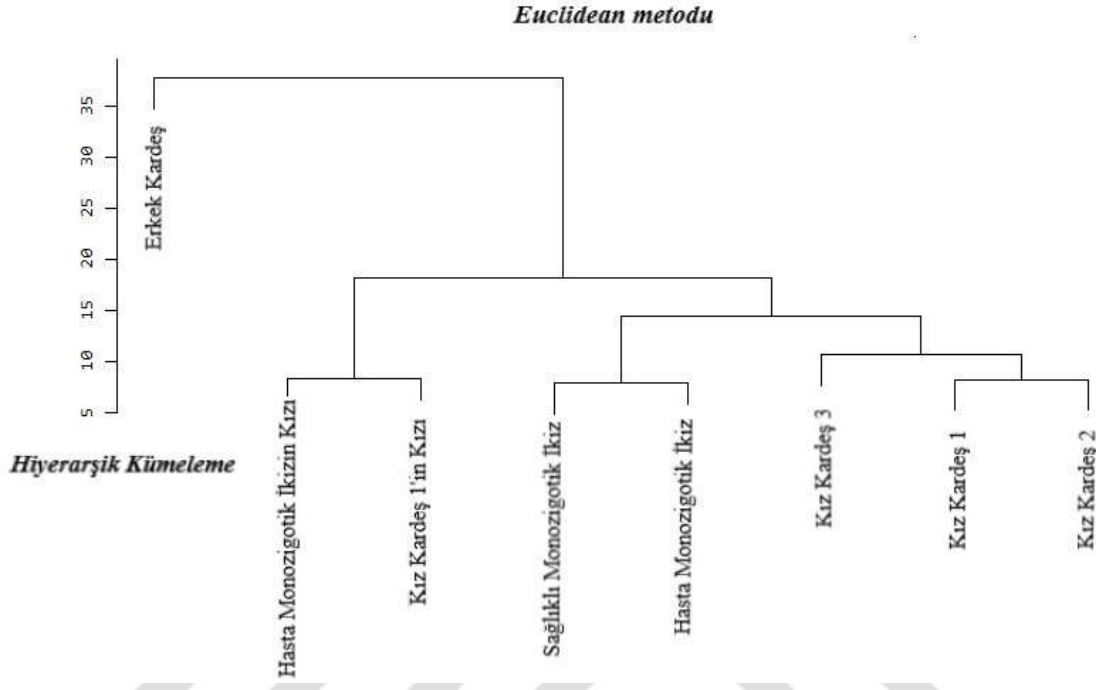


Şekil 4-4: Mikroarray problemlerinin normalizasyon öncesi ve sonrası logaritmik dağılım değerleri.



Şekil 4-5: Mikroarray problemlerin yoğunluklarının normalizasyon öncesi ve sonrası logaritmik dağılım değerleri.

Veri analizi sırasında, örnekler arasındaki korelasyonu belirlemek için ‘‘Euclidean’’ ve ‘‘Complete Linkage’’ kümeleme metodu kullanıldı. Bu veri analizi sonrasında Şekil 4-6’da belirtilen dendrogram belirlendi.



Şekil 4-6: Euclidean metodu kullanılarak verilerin kümelenmesi ve sınıflandırılması.

Çalışma kapsamında 2’si monozigotik ikiz olmak üzere, 6’sı *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı ve 2’si *BRCA* genleri açısından negatif aile bireyleri olmak üzere toplam 8 örnek incelenmiştir. Euclidean metodu kullanılarak hazırlanan miRNA analizine ilişkin kümelenme sonucu monozigotik ikiz kardeşlerin, ikinci kuşak çocukların ve mutasyon taşıyıcısı kız kardeşlerin ayrı ayrı gruplarda, *BRCA* genleri açısından herhangi bir mutasyonu bulunmayan erkek kardeşin hepsinden bağımsız olarak tek başına kümelendiği belirlenmiştir (Şekil 4-6). Euclidean metodu kümelenme verilerinin ardından, miRNA ifade düzeyi açısından her bir örnek ve gruplar arası karşılaştırmalar yapılarak veriler analiz edildi ve gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Çalışmada veri analizleri, gruplar arasındaki miRNA ekspresyon farklılıklarının ortaya çıkarılması ile gruplar arasındaki farklılıkların hastalık etiyolojisi, *BRCA1* mutasyon varlığı ve hastalığa yatkınlık oluşturma yönündeki etkileri olmak üzere 2 farklı bakış açısı kullanılarak yapıldı.

4.3. Çalışma Grupları Arasındaki miRNA Ekspresyon Farklılıklarının Değerlendirilmesi

Çalışmada miRNA veri analizi 7 farklı grupta gerçekleştirildi. Birinci grupta monozygotik ikiz kardeşler karşılaştırıldı. İkinci grupta *BRCA1* mutasyonu taşıyıcısı olan aile bireyleri ile *BRCA* genleri açısından taşıyıcı olmayan aile bireyleri karşılaştırıldı. Üçüncü grupta *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı over kanseri monozygotik ikiz ile *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı sağlıklı aile bireyleri karşılaştırıldı. Dördüncü grupta *BRCA1* mutasyon taşıyıcı over kanseri monozygotik ikiz ile *BRCA* genleri açısından taşıyıcı olmayan sağlıklı aile bireyleri karşılaştırıldı. Beşinci grupta *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı over kanseri monozygotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldı. Altıncı grupta monozygotik ikiz kardeşler ile geride kalan tüm aile bireyleri karşılaştırıldı. Yedinci grupta *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozygotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldı.

Örneklerin birbiri ile karşılaştırılması ve yedi farklı grubun ham veri analizi sonrası, 2549 adet miRNA'da ekspresyon farklılıkları tespit edildi. Bu ham veri analizinin ardından yapılan gruplar arası karşılaştırmada p değeri 0,05'den küçük ($p < 0.05$) ve ekspresyon düzeyi 2 kattan fazla ($|FC| \geq 2$) artan ve azalan miRNA'lar tespit edildi. Bu gruplar arası karşılaştırmalarda p-değeri ($p < 0.05$) ve Fold&Change ($|FC| \geq 2$) kriterlerine göre 43 adet ekspresyon farklılığı gösteren miRNA tespit edilirken, her bir örneğin birbiri ile Fold&Change ($|FC| \geq 2$) oranına göre karşılaştırıldığı analizlerde ise ilave 133 miRNA olmak üzere toplamda 176 miRNA'nın ekspresyon düzeyinde değişiklik olduğu tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre;

Birinci grupta; miRNA veri analizi her ikisi de *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı olan ancak biri fenotipik olarak etkilenmiş monozygotik ikiz kardeşler arasında yapıldı. Yapılan karşılaştırma sonrasında Fold&Change değerine göre ($|FC| \geq 2$) miR-197-3p, miR-92a-3p olmak üzere toplam 2 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, let-7i-5p, miR-125a-5p, miR-15b-5p, miR-320d, miR-342-3p, miR-4430, miR-451a, miR-766-3p olmak üzere toplam 8 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı tespit edildi (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Monozigotik ikiz kardeşler arasında farklılık gösteren miRNA'lar

miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-miR-197-3p	2,704552	Artmış
hsa-miR-92a-3p	2,09046	Artmış
hsa-let-7i-5p	-2,457404	Azalmış
hsa-miR-125a-5p	-5,960167	Azalmış
hsa-miR-15b-5p	-3,618161	Azalmış
hsa-miR-320d	-2,01319	Azalmış
hsa-miR-342-3p	-2,364664	Azalmış
hsa-miR-4430	-2,008545	Azalmış
hsa-miR-451a	-12,891987	Azalmış
hsa-miR-766-3p	-2,020043	Azalmış

İkinci grupta; *BRCA1* mutasyonu taşıyıcısı olan ve olmayan aile bireyleri karşılaştırıldı. p-değeri ($p < 0.05$) ve Fold&Change değeri ($|FC| \geq 2$) göz önüne alınarak yapılan veri analizine göre *BRCA1* mutasyonu taşıyıcısı olan aile bireylerinde miR-4281, miR-4449, miR-4653-3p, miR-6165, miR-874-3p olmak üzere toplam 5 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-320e, miR-324-3p, miR-3656, miR-4284, miR-4516, miR-4741, miR-484, miR-6089, miR-6869-5p, miR-6891-5p, miR-7107-5p, miR-7847-3p olmak üzere 16 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı tespit edildi (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: *BRCA1* mutasyonu taşıyıcısı olan aile bireyleri ile olmayan aile bireyleri arasında farklılık gösteren miRNA'lar

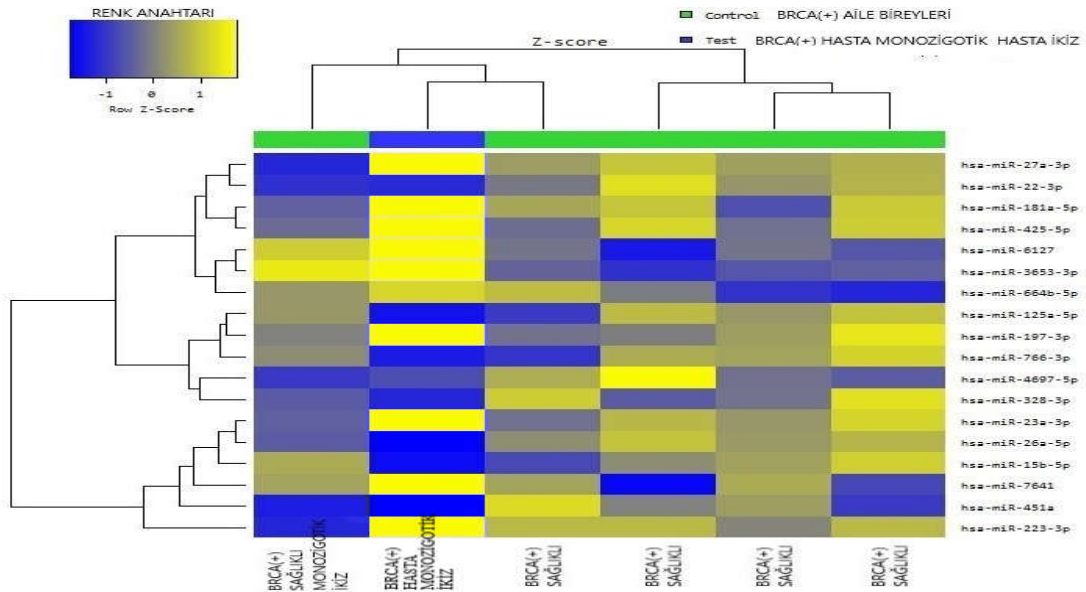
miRNA	FC Değeri	p Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-miR-4281	2,980563	2,29E-05	Artmış
hsa-miR-4449	2,051159	0,04423426	Artmış
hsa-miR-4653-3p	2,094555	0,02606936	Artmış
hsa-miR-6165	2,086894	0,01199842	Artmış
hsa-miR-874-3p	2,063295	0,00866246	Artmış
hsa-miR-320a	-2,348735	0,00345605	Azalmış
hsa-miR-320b	-2,196341	0,00697459	Azalmış
hsa-miR-320c	-2,014525	0,01408515	Azalmış
hsa-miR-320d	-2,151002	0,00878405	Azalmış
hsa-miR-320e	-2,197619	0,004604	Azalmış
hsa-miR-324-3p	-3,286423	0,01855668	Azalmış
hsa-miR-3656	-2,06298	0,00885974	Azalmış
hsa-miR-4284	-2,768072	0,02477868	Azalmış
hsa-miR-4516	-4,857087	0,01586675	Azalmış

Üçüncü grupta; *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı over kanserli monozygotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı diğer aile bireyleri karşılaştırıldı. Fold&Change değeri ($|FC| \geq 2$) karşılaştırılmasına göre miR-181a-5p, miR-197-3p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-3653-3p, miR-425-5p, miR-6127, miR-7641 olmak üzere 9 farklı miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, miR-125a-5p, miR-15b-5p, miR-22-3p, miR-26a-5p, miR-328-3p, miR-451a, miR-4697-5p, miR-664b-5p, miR-766-3p olmak üzere toplam 9 miRNA'nın ise ekspresyonunun düştüğü tespit edildi (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: *BRCA1* mutasyon taşıyıcı over kanserli monozygotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı diğer aile bireyleri arasında farklılık gösteren miRNA'lar

miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu	miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-miR-181a-5p	2,13969	Artmış	hsa-miR-125a-5p	-5,750141	Azalmış
hsa-miR-197-3p	3,235505	Artmış	hsa-miR-15b-5p	-3,076328	Azalmış
hsa-miR-223-3p	2,729016	Artmış	hsa-miR-22-3p	-2,13173	Azalmış
hsa-miR-23a-3p	2,26053	Artmış	hsa-miR-26a-5p	-2,238728	Azalmış
hsa-miR-27a-3p	2,424817	Artmış	hsa-miR-328-3p	-2,009777	Azalmış
hsa-miR-3653-3p	2,253102	Artmış	hsa-miR-451a	-2,632944	Azalmış
hsa-miR-425-5p	2,591611	Artmış	hsa-miR-4697-5p	-2,533742	Azalmış
hsa-miR-6127	2,043861	Artmış	hsa-miR-664b-5p	-2,88983	Azalmış
hsa-miR-7641	2,304401	Artmış	hsa-miR-766-3p	-2,124121	Azalmış

Üçüncü gruba ait yapılan incelemeye ilişkin Heat-Map grafiği ise aşağıda verilmiştir (Şekil 4-8). Heat-Map grafiğinde ekspresyonu artan örnekler sarı, ekspresyonu azalan örneklerle mavi olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-8: *BRCA1* mutasyon taşıyıcı over kanserli monozygotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı diğer aile bireylerinin karşılaştırıldığı Heat-Map grafiği.

Dördüncü grupta; *BRCAl* mutasyon taşıyıcısı olan over kanserli monozygotik ikiz ile mutasyon taşımayan aile bireyleri Fold&Change değerine ($|FC| \geq 2$) göre karşılaştırıldı. *BRCAl* mutasyon taşıyıcısı olan over kanserli monozygotik ikiz'de 36 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, 56 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Bu grupta azalan ve artan tüm miRNA aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4-6).

Tablo 4-6: *BRCAl* mutasyon taşıyıcısı olan over kanseri monozygotik ikiz ile mutasyon taşıyıcısı olmayan aile bireylerinin karşılaştırılması sonucu farklılık gösteren miRNA'lar

miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu	miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-let-7a-5p	4,911662	Artmış	hsa-miR-29a-3p	-2,780976	Azalmış
hsa-let-7b-5p	3,315138	Artmış	hsa-miR-30d-5p	-2,425373	Azalmış
hsa-let-7c-5p	2,994644	Artmış	hsa-miR-3135b	-3,978662	Azalmış
hsa-let-7d-5p	3,071893	Artmış	hsa-miR-3196	-2,272675	Azalmış
hsa-let-7f-5p	4,726002	Artmış	hsa-miR-324-3p	-2,928612	Azalmış
hsa-let-7g-5p	5,518241	Artmış	hsa-miR-342-3p	-2,701256	Azalmış
hsa-miR-103a-3p	3,962993	Artmış	hsa-miR-3665	-3,434024	Azalmış
hsa-miR-107	3,75968	Artmış	hsa-miR-3679-5p	-2,577278	Azalmış
hsa-miR-1260a	18,48686	Artmış	hsa-miR-3960	-4,777963	Azalmış
hsa-miR-1260b	9,728768	Artmış	hsa-miR-4284	-4,226758	Azalmış
hsa-miR-16-5p	2,756749	Artmış	hsa-miR-4428	-2,475481	Azalmış
hsa-miR-17-5p	5,087007	Artmış	hsa-miR-4430	-2,026077	Azalmış
hsa-miR-181b-5p	2,456934	Artmış	hsa-miR-4466	-3,297095	Azalmış
hsa-miR-197-3p	3,734982	Artmış	hsa-miR-4516	-4,267092	Azalmış
hsa-miR-20a-5p	5,859501	Artmış	hsa-miR-451a	-5,524989	Azalmış
hsa-miR-21-5p	5,325501	Artmış	hsa-miR-4530	-2,723704	Azalmış
hsa-miR-24-3p	3,48031	Artmış	hsa-miR-4687-3p	-2,038184	Azalmış
hsa-miR-26b-5p	2,612808	Artmış	hsa-miR-4697-5p	-4,198253	Azalmış
hsa-miR-27a-3p	3,813185	Artmış	hsa-miR-4741	-3,803855	Azalmış
hsa-miR-331-3p	3,891682	Artmış	hsa-miR-4787-5p	-9,732669	Azalmış
hsa-miR-3653-3p	2,758276	Artmış	hsa-miR-494-3p	-3,029684	Azalmış
hsa-miR-4281	3,303853	Artmış	hsa-miR-5001-5p	-5,003176	Azalmış
hsa-miR-4286	13,810503	Artmış	hsa-miR-5006-5p	-2,426571	Azalmış
hsa-miR-4449	2,37981	Artmış	hsa-miR-564	-2,154572	Azalmış
hsa-miR-486-5p	2,458769	Artmış	hsa-miR-5787	-4,119433	Azalmış
hsa-miR-5100	9,343162	Artmış	hsa-miR-6068	-4,509364	Azalmış
hsa-miR-572	4,583811	Artmış	hsa-miR-6087	-2,370684	Azalmış
hsa-miR-5739	2,153956	Artmış	hsa-miR-6088	-3,177947	Azalmış
hsa-miR-574-5p	2,880802	Artmış	hsa-miR-6089	-5,127406	Azalmış
hsa-miR-6085	3,082576	Artmış	hsa-miR-6090	-3,881072	Azalmış

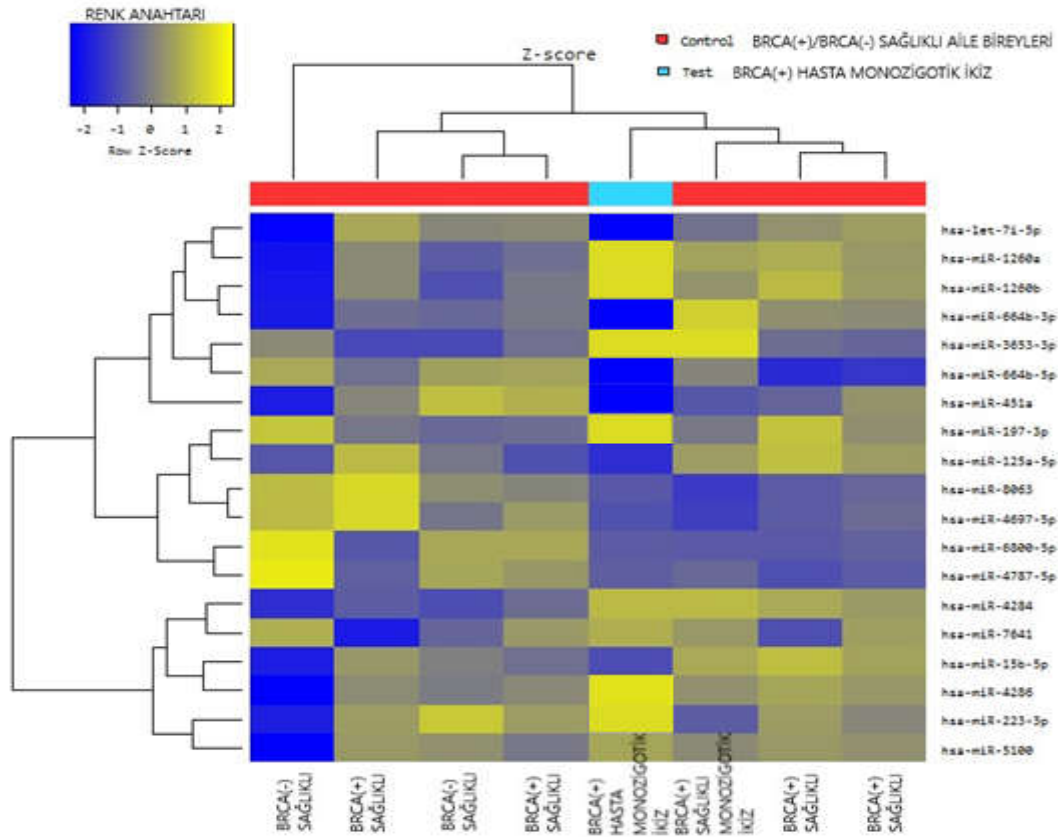
hsa-miR-6165	2,520845	Artmış	hsa-miR-6124	-2,141177	Azalmış
hsa-miR-664b-3p	5,345214	Artmış	hsa-miR-6125	-4,380067	Azalmış
hsa-miR-6840-3p	2,602478	Artmış	hsa-miR-638	-5,057578	Azalmış
hsa-miR-7114-5p	2,997957	Artmış	hsa-miR-6510-5p	-2,528293	Azalmış
hsa-miR-7975	3,551201	Artmış	hsa-miR-6785-5p	-3,583819	Azalmış
hsa-miR-7977	9,532689	Artmış	hsa-miR-6800-5p	-6,4653	Azalmış
hsa-let-7i-5p	-6,439927	Azalmış	hsa-miR-6812-5p	-2,384195	Azalmış
hsa-miR-1225-5p	-2,31569	Azalmış	hsa-miR-6821-5p	-3,339263	Azalmış
hsa-miR-125a-5p	-2,510113	Azalmış	hsa-miR-6869-5p	-5,165367	Azalmış
hsa-miR-126-3p	-4,668515	Azalmış	hsa-miR-7107-5p	-3,136344	Azalmış
hsa-miR-1275	-3,387937	Azalmış	hsa-miR-7110-5p	-3,108043	Azalmış
hsa-miR-142-3p	-6,118209	Azalmış	hsa-miR-7150	-4,941677	Azalmış
hsa-miR-1915-3p	-4,487989	Azalmış	hsa-miR-7704	-5,630115	Azalmış
hsa-miR-22-3p	-2,99062	Azalmış	hsa-miR-7847-3p	-3,256609	Azalmış
hsa-miR-26a-5p	-2,190384	Azalmış	hsa-miR-8063	-3,346606	Azalmış
hsa-miR-2861	-4,704319	Azalmış	hsa-miR-8069	-2,171955	Azalmış

Beşinci Grupa; *BRCAl* mutasyon taşıyıcısı over kanserli monozygotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldı. Fold&Change değeri ($|FC| \geq 2$) göz önüne alınarak yapılan incelemede miR-1260a, miR-1260b, miR-197-3p, miR-223-3p, miR-3653-3p, miR-4286, miR-5100, miR-7641 olmak üzere 8 farklı miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, let-7i-5p, miR-125a-5p, miR-15b-5p, miR-4284, miR-451a, miR-4697-5p, miR-4787-5p, miR-664b-5p, miR-6800-5p, miR-8063 olmak üzere toplam 10 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı tespit edildi (Tablo 4-7).

Tablo 4-7: *BRCAl* mutasyon taşıyıcısı over kanserli monozygotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırılması sonucu artan ve azalan miRNA'lar

miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu	miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-miR-1260a	3,557224	Artmış	hsa-miR-125a-5p	-4,537593	Azalmış
hsa-miR-1260b	2,466414	Artmış	hsa-miR-15b-5p	-2,24685	Azalmış
hsa-miR-197-3p	3,370974	Artmış	hsa-miR-4284	-2,16984	Azalmış
hsa-miR-223-3p	2,354776	Artmış	hsa-miR-451a	-3,253944	Azalmış
hsa-miR-3653-3p	2,387167	Artmış	hsa-miR-4697-5p	-2,92699	Azalmış
hsa-miR-4286	2,585066	Artmış	hsa-miR-4787-5p	-2,217036	Azalmış
hsa-miR-5100	2,047163	Artmış	hsa-miR-664b-5p	-2,282081	Azalmış
hsa-miR-7641	2,100135	Artmış	hsa-miR-6800-5p	-2,050635	Azalmış
hsa-let-7i-5p	-2,03075	Azalmış	hsa-miR-8063	-2,024844	Azalmış

Beşinci gruba ait yapılan incelemeye ilişkin Heat-Map grafiği ise aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9). Heat-Map grafiğinde ekspresyonu artan örnekler sarı, ekspresyonu azalan örneklerle mavi olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-9: BRCA1 mutasyon taşıyıcısı over kanserli monozigotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldığı Heat-Map grafiği.

Altıncı grupta: Hasta ve sağlıklı monozigotik ikiz kardeşler ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldı. p-değeri ($p < 0.05$) ve Fold&Change değerleri ($|FC| \geq 2$) göz önüne alınarak yapılan karşılaştırılmada monozigotik ikizlerde miR-1305, miR-3651, miR-3653-3p, miR-6131 olmak üzere toplam 4 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı tespit edildi (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: Over kanseri hasta ve sağlıklı monozigotik ikiz kardeşler ile tüm aile bireyleri karşılaştırılması sonucu farklılık gösteren miRNA'lar

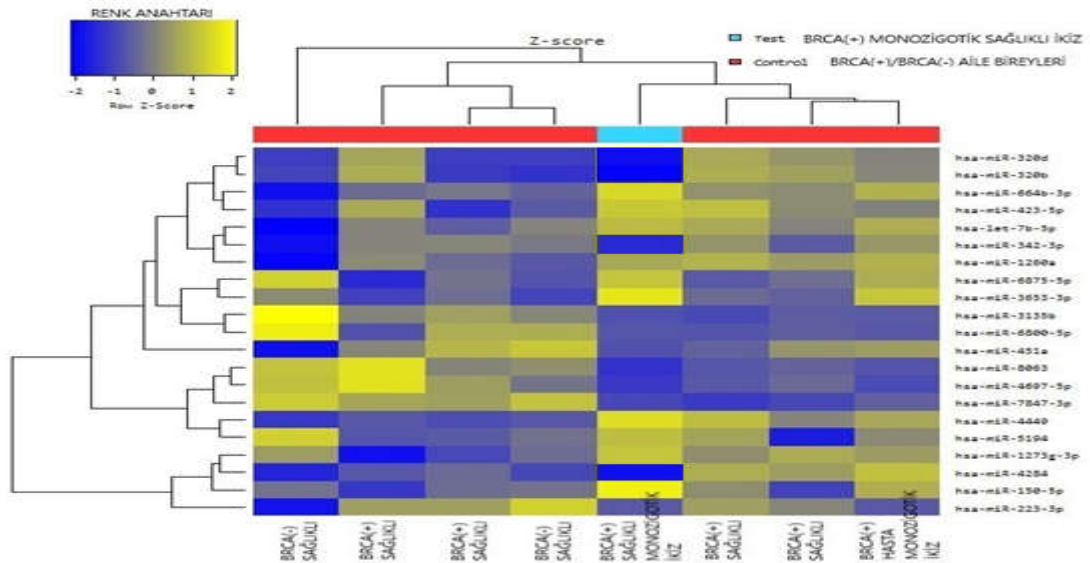
miRNA	FC Değeri	p Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-miR-1305	2,327913	0,02857746	Artmış
hsa-miR-3651	2,888196	0,00530336	Artmış
hsa-miR-3653-3p	3,308742	0,01717619	Artmış
hsa-miR-6131	2,606371	0,03814972	Artmış

Yedinci grupta: *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozygotik ikiz ile tüm aile bireyleri karşılaştırıldı. Fold-change değeri ($|FC| \geq 2$) göz önüne alınarak yapılan analizde 10 miRNA'nın ekspresyonunun arttığı, 11 miRNA'nın ise ekspresyonunun azaldığı tespit edildi (Tablo 4-9).

Tablo 4-9: *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozygotik ikiz ile tüm aile bireyleri arasında farklılık gösteren miRNA'lar

miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu	miRNA	FC Değeri	Ekspresyon Durumu
hsa-let-7b-5p	2,120731	Artmış	hsa-miR-150-5p	-3,199167	Azalmış
hsa-miR-1260a	2,757128	Artmış	hsa-miR-3135b	-2,007977	Azalmış
hsa-miR-1273g-3p	2,670782	Artmış	hsa-miR-320b	-2,109281	Azalmış
hsa-miR-223-3p	2,354776	Artmış	hsa-miR-320d	-2,326292	Azalmış
hsa-miR-3653-3p	3,540435	Artmış	hsa-miR-342-3p	-3,714417	Azalmış
hsa-miR-423-5p	2,090538	Artmış	hsa-miR-4284	-2,16984	Azalmış
hsa-miR-4449	2,624993	Artmış	hsa-miR-451a	-5,708564	Azalmış
hsa-miR-5194	2,036762	Artmış	hsa-miR-4697-5p	-4,246157	Azalmış
hsa-miR-664b-3p	4,135504	Artmış	hsa-miR-6800-5p	-2,12746	Azalmış
hsa-miR-6875-5p	2,224776	Artmış	hsa-miR-7847-3p	-2,102225	Azalmış
			hsa-miR-8063	-3,433486	Azalmış

Yedinci gruba ait yapılan incelemeye ilişkin Heat-Map grafiği ise aşağıda verilmiştir (Şekil 4.10). Heat-Map grafiğinde ekspresyonu artan örnekler sarı, ekspresyonu azalan örneklerle mavi olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-10: *BRCA1* mutasyon taşıyıcısı sağlıklı monozygotik ikiz ile tüm aile bireylerinin karşılaştırıldığı Heat-Map Grafiği.

4.4. miRNA'ların Hastalık Etiyolojisi, Mutasyon Taşıyıcılığı ve Hastalık Riski Açısından Değerlendirilmesi

Hastalık etiyolojisi, mutasyon taşıyıcılığı ve hastalığa yatkınlığın değerlendirilmesi amacıyla yapılan veri analizleri sonuçları sırasıyla aşağıda bildirilmiştir.

İlk olarak; BRCA1 gen mutasyon taşıyıcılarında artan ve azalan miRNA'lar belirlenmiştir. *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkili, istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu artan toplam 6 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla miR-4449, miR-4653-3p, miR-486-5p, miR-5739, miR-6165, miR-874-3p'den oluşmaktadır (Tablo 4-10). İstatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu azalan ise 19 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla miR-126-3p, miR-320a, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-320e, miR-324-3p, miR-3656, miR-4284, miR-4428, miR-4516, miR-4741, miR-484, miR-564, miR-6089, miR-6869-5p, miR-6891-5p, miR-7107-5p, miR-7847-3p'den oluşmaktadır (Tablo 4-11).

Tablo 4-10: *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
miR-4449	2,56	CGUCCCGGGGCGCGGAGGCA	Artmış	ZFHX3
miR-4653-3p	2,92	UGGAGUUAAGGGUUGCUUGGAGA	Artmış	ATG2A, CREBL2, MAT2A, FRS2, TMED4, UBN2
miR-486-5p	3,34	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	Artmış	OLFM4, CD40, ARHGAP5, IGF1R, DOCK3, CADM1
miR-5739	2,03	GCGGAGAGAGAAUGGGGAGC	Artmış	DLX6, CD207, CHIC1, PPL2A, PLXDC1
miR-6165	2,24	CAGCAGGAGGUAGAGGGGAG	Artmış	PER1, TFAP2A, FADS1, AMER1, LUZP1, COX6B1
miR-874-3p	2,075	CUGCCUGGCCCGAGGGACCGA	Artmış	HDAC1, AQP3, STAT3, CDK9

Tablo 4-11: *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
miR-126-3p	-24,03	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	Azalmış	TOM1, CRK, VEGFA, SOX2, TWF1, PITPNC1, IGFBP2, KRAS
miR-320a	-2,55	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	Azalmış	MCL1, BANP, ITGB3, BMI1, NRPI, NFATC3, TRPC5
miR-320b	-2,45	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	Azalmış	CDK6, DCTN5, SYNCRIP, ARF1, BCL9L, ZNF600
miR-320c	-2,26	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	Azalmış	SYNCRIP, FBXO28, SMARCC, NPM3
miR-320d	-2,39	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	Azalmış	DCTN5, SYNCRIP, FBXO28
miR-320e	-2,42	AAAGCUGGGUUGAGAAGG	Azalmış	DCTN5, NPM3, ZNF275, DDX19A, NCAPD2, TXNL1

miR-324-3p	-2,98	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	Azalmış	WNT9B, CREBBP, DVL2, WNT2B
miR-3656	-2,16	GGCGGGUGCGGGGUGG	Azalmış	MRPL12, LSP1, MNT, PRDM2, ZNF770, CECR1
miR-4284	-2,96	GGGCUCACAUCACCCCAU	Azalmış	BCL2L11, RBBP5, HNRNP A1, ZNF264, TRIB3, CRTAP
miR-4428	-6,05	CAAGGAGACGGGAACAUGGAGC	Azalmış	MSL1, MAPRE3, MYH14, CASP2, CCND2, CDK14, TP63
miR-4516	-4,34	GGGAGAAGGGUCGGGGC	Azalmış	STAT3, M6PR, GPR137C, CCND2, CCNT1, CDKN1A, SCOC, TP53
miR-4741	-3,65	CGGGCUGUCCGGAGGGGUCGGCU	Azalmış	DDX39B, MAPK1, ZBTB39, HMGA1,
miR-484	-2,97	UCAGGCUCAGUCCCCUCCGAU	Azalmış	FIS1, PAGR1, ZEB1, SLC11A2, SMAD2, ANAPC7, TBRG1
miR-564	-2,45	AGGCACGGUGUCAGCAGGC	Azalmış	GID4, CNBP, E2F3, RCAN3, AKT2, APPL1, SLC1A2, GPR155
miR-6089	-6,03	GGAGGCCGGGGUGGGCGGGGCGG	Azalmış	NKX2, TPT1, KCTD5, BBX, SGCD, CDH7, CCNB1,
miR-6869-5p	-5,38	GUGAGUAGUGGCGCGGCGGC	Azalmış	TUBB2A, MAPK1, NRBF2, WEE1, HMGA2, MAPK1, STAG2
miR-6891-5p	-2,23	UAAGGAGGGGGAUGAGGGG	Azalmış	CHD4, CD207, DDX6, CHRDL1, CCND2, TP63
miR-7107-5p	-3,43	UCGGCCUGGGGAGGAGGAAGGG	Azalmış	VAV3, CASP16, CCND1, CASP16, MAPK14,
miR-7847-3p	-3,1	CGUGGAGGACGAGGAGGAGGC	Azalmış	HAVCR1, POTES, DNAJC10, SOD2, M6PR, CDK19

İkinci olarak; *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve epitelyal over kanseri ile ilişkili, istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu artan toplam 13 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla miR-1260a, miR-1260b, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-181b-5p, miR-26b-5p, miR-4281, miR-4286, miR-5100, miR-6840-3p, miR-7114-5p, miR-7975, miR-7977'den oluşmaktadır (Tablo 4-12). İstatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu azalan ise toplam 30 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla miR-1225-5p, miR-142-3p, miR-26a-5p, miR-2861, miR-29a-3p, miR-30d-5p, miR-3196, miR-342-3p, miR-3665, miR-3960, miR-4466, miR-4530, miR-4687-3p, miR-4787-5p, miR-494-3p, miR-5001-5p, miR-5006-5p, miR-5787, miR-6068, miR-6087, miR-6088, miR-6090, miR-6124, miR-6125, miR-638, miR-6510-5p, miR-6800-5p, miR-7704, miR-8063, miR-8069'dan oluşmaktadır (Tablo 4-13).

Tablo 4-12: *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Molekülleri
miR-1260a	11,71	AUCCACCUCUGCCACCA	Artmış	PSAT1, UNC13A, RPS27, BRD7
miR-1260b	6,65	AUCCACCACUGCCACCAU	Artmış	SFRP1, DKK2, SMAD4, PSAT1, UNC13A, RPS27
miR-16-5p	11,5	UAGCAGCACGUAAUAUUGGCG	Artmış	CCNE1, ARL2, BCL2, HMGA1, CDK6, CCND1, VEGFA, RECK, PRDM4
miR-17-5p	23,2	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	Artmış	TGFBR2, PTEN, CDKN1A, BCL2L11, E2F1, TP53, STAT3, FBXO31
miR-181b-5p	2,85	AACAUUAUUGCUGUCGGUGGGU	Artmış	TCL1A, TIMP3, PLAG1, BCL2, RNF2, GRIA2, VSNL1, ATM

miR-26b-5p	12,56	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	Artmış	PTGS2, EPHA2, CHORDC1, EZH2, CCNE1, ABCA1, GATA4
miR-4281	2,75	GGGUCCGGGGAGGGGGG	Artmış	NCDN, CDKN1A, BCL3
miR-4286	25,63	ACCCACUCCUGGUACC	Artmış	LDLR, ZNF354B, NSD1, RABGAP1, TAOK1, MKNK2
miR-5100	17,1	UUCAGAUCCAGCGUGCCUCU	Artmış	COX10, DEK, KCNN3, RAB11FIP1, DYNLT1, NOTCH2
miR-6840-3p	2,51	GCCCAGGACUUUGUGCGGGGUG	Artmış	SLFN12L, CTC1, GXYLT2, GDE1, FADS1, PER1, ATG9A
miR-7114-5p	2,89	UCUGUGGAGUGGGUGCCUGU	Artmış	M6PR, HNRNPUL1, SHMT1, ZNF529, ACVR2B, PAICS, TAF8, GZMM
miR-7975	6,94	AUCCUAGUCACGGCACCA	Artmış	KBTBD8, GULP1, CASZ1, RAD51
miR-7977	16,13	UUCCAGCCAACGCACCA	Artmış	HSPA1B, ZNF703, TMEM185B, SF3B3, COX6B1, CCDC9, CDH7

Tablo 4-13: *BRCAl* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
miR-1225-5p	-5,12	GUGGGUACGGCCAGUGGGGGG	Azalmış	ORC4, ODF2L, MTRNR2L7, PSMG2, MTRNR2L3
miR-142-3p	-29,06	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	Azalmış	ARNTL, TGFBR1, RAC1, ROCK2, HMGA1, CCNT2, TAB2, PTPN23, EZH2, RBL, ADAM17, HMGA2, CCND2, CPEB3, DNMT3B
miR-26a-5p	-7,88	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	Azalmış	LY6E, CCDC64, CCND1, DARS2, APAF1
miR-2861	-4,57	GGGGCCUGGCGGUGGGCGG	Azalmış	MCL1, CDK6, SPARC, DNMT3A, DNMT3B, COL4A1, PPM1D, TET1
miR-29a-3p	-8,67	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	Azalmış	GNAI2, TP53, CASP3, SNAI1, EZH2, BCL9, NOTCH1, SMAD1
miR-30d-5p	-4,45	UGUAAACAUCGGACUGGAAG	Azalmış	POU3F3, TULP1, H2AFX, PCGF3, CASP16, ATG2A, CCDC64
miR-3196	-4,55	CGGGGCGGCAGGGGCCUC	Azalmış	GEMIN4, DNMT1, ID4, SREBF1, SREBF2, BMP7, RMND5A
miR-342-3p	-3,7	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	Azalmış	RAB5C, DNAJC15, ZNF85, MRPL17, ELF4, ENPP6, CASP2
miR-3665	-2,75	AGCAGGUGCGGGGCGGCG	Azalmış	POU3F3, PRX, PIAS4, PEG10
miR-3960	-4,64	GGCGGCGGCGAGGCGGGGG	Azalmış	NAGK, NFX1, F2R, DDA1, AACS
miR-4466	-2,9	GGGUGCGGGCGGCGGGGG	Azalmış	HES4, DMPK, CALM2, GPRC5A, ATAT1, CALM2, PTCH1
miR-4530	-3,06	CCCAGCAGGACGGGAGCG	Azalmış	ZBTB39, SLC37A4, ADAP1, FHL2, BARHL1, AKAP6
miR-4687-3p	-2,01	UGGUGUUGGAGGGGGCAGGC	Azalmış	STMN3, VPS51, MYADM, CYP2B6, SNX19, PER3, FN3K
miR-4787-5p	-7,7	GCGGGGGUGGCGGCGGAUCCC	Azalmış	PTEN, CDK6, MYC, BCL2L11, BCL2, ATXN1, MAPK1, MDM4
miR-494-3p	-8,32	UGAAACAUACACGGGAACCUC	Azalmış	SPTBN2, RAD54L2, POU2F3, NF2, CDK2, COX6B1, MAP3K9
miR-5001-5p	-4,8	AGGGCUGGACUCAGCGGCGGAGCU	Azalmış	KLHL15, ZNF354B, GIGYF1, ACTG1, RRP7A, PRPF40A
miR-5006-5p	-3,1	UUGCCAGGGCAGGAGGUGGAA	Azalmış	ELF5, RAB5B, ORC4, CD4, MSH5, NF2, PARP2, PTEN
miR-5787	-5,16	GGGUGGGGCGCGGGGAGGU	Azalmış	BTG1, DUSP3, TMEM170A
miR-6068	-3,75	CCUGCGAGUCUCCGGCGGUGG	Azalmış	GSG2, FADS1, CNBP, AGO3, CSTF2, HOXD3, BAG5
miR-6087	-3,23	UGAGGCGGGGGGGCGAGC	Azalmış	USP42, SECISBP2L, RAB22A, CASP5, MAPK1
miR-6088	-3,21	AGAGAUGAAGCGGGGGGCG	Azalmış	AVL9, QSOX2, GNAI2, FAM43A, E2F6, MAP3K2
miR-6090	-3,83	GGGGAGCGAGGGGCGGGGC	Azalmış	DNAJB9, BCAN, E2F3, RAD21, BCL2L12, CASP3, CDKN1A
miR-6124	-3,3	GGGAAAAGGAAGGGGAGGA	Azalmış	HAVCR1, AEN, ZMYM1, BICD2, BCR, CASP16
miR-6125	-4,6	GCGGAAGGCGGAGCGGCGGA	Azalmış	

miR-638	-4,7	AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU	Azalmış	OSCP1,SP2,SOX2,HIST2H4A, HIST2H4B,BRCA1,CD4,SOD2 ABT1,BNC2,TPM3,
miR-6510-5p	-2,82	CAGCAGGGGAGAGAGAGGAGUC	Azalmış	COX6B1,AGO1,BCL2L13,MAP2K7
miR-6800-5p	-4,67	GUAGGUGACAGUCAGGGGCGG	Azalmış	SERBP1,MYCBP,CDK2,DICER1
miR-7704	-5,28	CGGGGUCGGCGGCGACGUG	Azalmış	IFNAR1,KCNH1,TEX261, SDF4 BCL2L11, AGO3,DNAJC21,
miR-8063	-4,01	UCAAAAUCAGGAGUCGGGGCUU	Azalmış	E2F2,ERBB3
miR-8069	-6,63	GGAUGGUUGGGGCGGUCGGCGU	Azalmış	BTG3, UBA6, RPS27, CCND1, CDK2AP2, DICER1, HHLA1

Üçüncü olarak; Epitelyal over kanseri ile ilişkili, istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu artan toplam 14 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla let-7a-5p, let-7b-5p, miR-181a-5p, miR-197-3p, miR-21-5p, miR-223-3p, miR-23a-3p, miR-27a-3p, miR-3653-3p, miR-425-5p, miR-572, miR-574-5p, miR-6127, miR-7641'den oluşmaktadır (Tablo 4-14). İstatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu azalan ise toplam 11 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla let-7i-5p, miR-125a-5p, miR-15b-5p, miR-150-5p, miR-22-3p, miR-328-3p, miR-4430, miR-451a, miR-4697-5p, miR-664b-5p, miR-766-3p'den oluşmaktadır (Tablo 4-15).

Tablo 4-14: Epitelyal over kanseri ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
let-7a-5p	10,87	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	Artmış	NF2, KRAS, HMGA2, HMGA1, CDK6, NRAS
let-7b-5p	3,79	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGUU	Artmış	HMGA1, IGF2BP1, CDC34, HMGA2, CDC25A, IGF2BP2
miR-181a-5p	3,2	AACAUAUACGCGUGCGGUGAGU	Artmış	CDKN1B, ATM, BCL2, KRAS, MAPK1, BRCA1, CDH13, KRAS, MMP14, NOTCH1, NOTCH2,
miR-197-3p	2,8	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	Artmış	CD82, PMAIP1, MTHFD1, RAD51, AGO1, CASP10, CHECK1
miR-21-5p	6,75	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	Artmış	CDC25A, BCL2, PTEN, APAF1, E2F1, TP53, MSH2
miR-223-3p	6,55	UGUCAGUUUGUCAAUACCCCA	Artmış	IGF1R, PARP1, E2F1, CDK2,ATM,STAT5A, E2F1
miR-23a-3p	5,98	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	Artmış	MYH1, MYH2, MYH4, PTEN, APAF1, FOXO3, CDH1, MYC
miR-27a-3p	17,27	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	Artmış	FOXO1, SP1, APC, EGFR, CCND1, CDH6, NF1, NRAS, TP53, WNT9B,
miR-3653-3p	2,97	CUAAGAAGUUGACUGAAG	Artmış	CCND2, MYLIP, MTMR4, SMAD5, PTEN
miR-425-5p	6,08	AAUGACACGAUCACUCCGUUGA	Artmış	CCND1, PTEN, FGFR3, DICER1, E2F3, MAP2K6, NRAS,
miR-572	3,34	GUCCGCUCGGCGGUGGCCCA	Artmış	CDKN1A, MED29, WNT7A, ATM
miR-574-5p	3,46	UGAGUGUGUGUGUGAGUGUGU	Artmış	FOXN3, PPP2R1B, BCL10, CCND1, CDH12, CDK15, CDKN1A, MAPK10
miR-6127	2,32	UGAGGGAGUGGGUGGGAGG	Artmış	TUBB2A, MYH14, DLX6, HHIP, CHRDL1
miR-7641	3,14	UUGAUCUCGGAAGCUAAGC	Artmış	TRIP4, TAOK1, ARL5C, COX20, PPWD1, SLC30A4

Tablo 4-15: Epitelial over kanseri ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA'lar ve bu miRNA'ların hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
let-7i-5p	-11,77	UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU	Azalmış	TLR4, BMP4, EIF2C1, NEUROG1, SOCS1, IL13, IGF1,
miR-125a-5p	-4,11	UCCUGAGACCCUUUAACUGUGA	Azalmış	ERBB3, CDKN1A, TP53, ERBB2, EGFR, STAT3, MYC, VEGFA
miR-15b-5p	-3,6	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	Azalmış	BCL2, VEGFA, CCND1, CCNE1, CDK1, CDK4, CDK6, E2F3, MAPK1
miR-150-5p	-2,77	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	Azalmış	EGR2, ZEB1, MUC4, MYB, TP53, BIRC5
miR-22-3p	-8,92	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	Azalmış	CDKN1A, WNT1, ERBB3, MYCBP, HMGB1, BMP6, E2F2, PTEN
miR-328-3p	-2,17	CUGGCCUCUCUGCCCUCCGU	Azalmış	CD44, MMP16, AGO1, RAD51
miR-4430	-2,35	AGGUGGAGUGAGCGGAG	Azalmış	ZNF485, ABL2, MAPK1, MSH5, PTEN
miR-451a	-37,84	AAACCGUUACCAUUCAGAGUU	Azalmış	CPNE3, RAB5A, IL6R, AKT1, MMP2
miR-4697-5p	-5,5	AGGGGGCGCAGUCACUGACGUG	Azalmış	SIX5, BCL7A, MEN1, VGF
miR-664b-5p	-3,21	UGGGCUAAGGGAGAUGAUUGGGUA	Azalmış	CD55, MSN, RHOB, TB3, PLAG1
miR-766-3p	-2,5	ACUCCAGCCCCACAGCCUCAGC	Azalmış	COX1, MAPK1, NF2, RAD51, STK4, STK24, VEGFC

Dördüncü grupta; Epitelial over kanserine yatkınlık ile ilişkili, istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonlarının yüksek olduğu saptanan toplam 5 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar sırasıyla miR-1273g-3p, miR-1305, miR-3651, miR-6131, miR-92a-3p'den oluşmaktadır (Tablo 4-16). İstatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu azalan ise 1 miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA miR-3135b'dir (Tablo 4-17).

Tablo 4-16: Epitelial over kanserine yatkınlık ile ilişkili ekspresyonu artan miRNA'lar ve hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
miR-1273g-3p	3,57	ACCACUGCACUCCAGCCUGAG	Artmış	ZNF138, TMEM239, BMP3
miR-1305	2,05	UUUUCAACUCUAAUGGGAGAGA	Artmış	PTPN4, PRKAA1, PAPD7, FRAT2, DEPDC1, FBXO41
miR-3651	2,17	CAUAGCCCGGUCGUGGUACAUGA	Artmış	RACGAP1, OLA1, TEX261, PTGS1, NFIC, ZNF200
miR-6131	2,22	GGCUGGUCAGAUGGGAGUG	Artmış	PAGR1, IGF2BP1, CACNG8
miR-92a-3p	2,26	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	Artmış	STAT3, PTEN, MAP2K4, ATM, CDH1, NFKB1, NOTCH2

Tablo 4-17: Epitelial over kanserine yatkınlık ile ilişkili ekspresyonu azalan miRNA ve hedef molekülleri

miRNA	FC Değeri	Dizi	Ekspresyon Durumu	Olası Hedef Moleküller
miR-3135b	-4,38	GGCUGGAGCGAGUGCAGUGGUG	Azalmış	PIGO, POTES, SOD2, BIRC5, ABL2, MAPK1, MYCN

5. TARTIŞMA

Jinekolojik kanser türleri arasında over kanseri malignite ve mortalite oranı yüksek olan ve en sık görülen ikinci jinekolojik kanserdir [2]. Malign over tümörlerinin yaklaşık %90'ını ise overin yüzey epitelinden köken alan EOK oluşturmaktadır [6]. Vakalar yüksek oranda (%70), ileri evrelerde (evre III ve IV) teşhis edilir ve 5 yıllık sağkalım oranı %40'dan azdır. Evre I'de tanısı konulan EOK'lı olguların 5 yıllık sağkalım oranı %80-90'a, Evre II'de teşhis edilen olguların ise sağkalım oranı %60-70'e kadar çıkmaktadır [7]. Günümüzde yeni teşhis edilen over kanseri için geçerli olan standart optimal tedavi, sitoredüktif cerrahi ile platin bazlı kemoterapi kombinasyonudur. Radikal cerrahi ve kemoterapi stratejilerindeki önemli ilerlemeler, klinik sonuçların iyileşmesine yol açmıştır. Tüm bu gelişmelere rağmen, nüks ve tedaviye direnç açısından önemli riskler bulunmaktadır ve bunlar gerçekleştiğinde, over kanseri halen tedavisi gerçekleştirilemeyen bir hal almaktadır [5]. Mevcut over kanseri biyobelirteçleri kanser antijen-125 ve kanser antijen-15-3 (CA125, CA15-3), klinik olarak teşhis edilen hastalık için hassasiyete sahiptir, ancak erken evre hastalık tanısında ve malign oluşumların benign oluşumlardan ayrılmasında yüksek duyarlığa sahip değildir [8]. Bu nedenle, günümüzde erken teşhisi sağlayacak biyobelirteçlerin ve daha akıllı tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine acil bir ihtiyaç vardır. Halen günümüzde over kanseri taraması ve erken evrelerde teşhisini sağlayacak onaylanmış yüksek hassasiyete ve yalnızca malignite tespiti yapabilen bir klinik test bulunmamaktadır.

Tez çalışmasında özellikle yüksek riskli over kanserinde, over kanserinin tanısında ve izlenmesinde kullanılabilecek invaziv olmayan biyobelirteçlerin saptanması hedeflendi. Kanser çalışmalarında miRNA'ların kanser hücreleri ve normal hücreler arasında ekspresyon düzeyinin karşılaştırılabilir olması oldukça önemlidir. miRNA'lar, mRNA'ları hedef alarak gen ekspresyonunu düzenleyebilen 19-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan düzenleyici RNA'lardır [10].

Birçok çalışmada miRNA genlerinin %50'sinden daha fazlasının kanserle ilişkili genomik bölgeler ya da kırılğan bölgeler içerisinde yer aldıkları bildirilmiştir [12, 13]. Bu bulgular miRNA'ların kanser tanısında kullanılabileceğini ve onların kanser patogenezinde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir.

Tez çalışmasında yüksek riskli over kanser ailesine mensup *BRCA1* geninde mutasyonu olan ve olmayan bireylerin periferik kan örnekleri kullanıldı. Bu kapsamda bireylerin lenfositlerinden izole edilen miRNA örnekleri analiz edildi. İstatistiksel analiz sonrası gruplar arasında yapılan değerlendirmeler sonucu, gruplar arası ekspresyonu artan ve azalan miRNA'lar belirlendi (Tablo 4-10, 4-11, 4-12, 4-13, 4-14, 4-15, 4-16 ve 4-17).

Bireyler ve gruplar arası karşılaştırmalar sonrası *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve buna bağlı olarak over kanseri oluşumu ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyonu artan bazı miRNA'ların farklı çalışmalarla korelasyon gösterdiği görüldü. Çalışmamızda ekspresyonu artan miR-4449'un, Shen ve arkadaşları(ark.) tarafından yapılan bir çalışma sonucu, multipl miyeloma tanısında periferik kan temelli potansiyel bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmaktadır [150]. Ekspresyonu artan miR-4653-3p'ün ise Zhong ve ark. tarafından yapılan çalışma sonucu, primer meme tümörlerinde yüksek oranda arttığı, ayrıca bu miRNA'nın hedeflerinden biri olan FRS2'yi de etkileyerek tamoksifen direncinin gelişmesinde etkin olduğu, tamoksifen direncinin kırılmasında, miR-4653-3p ifadesinin bastırılmasının ve FGFR/FRS2 sinyal etkileşiminin durdurulmasının ilaç geliştirilmesi açısından umut verici bir yolak olduğu vurgulanmaktadır [151]. Çalışmamızda ekspresyon artışı gösteren miR-4449 ve miR-4653-3p'nin olası hedef molekülleri olan ZFHX3 ve CREBL2'yi etkileyerek *BRCA1* ilişkili over kanserine neden olduğu düşünülmektedir.

Ma ve ark. tarafından yapılan çalışmada, miR-486-5p artan ekspresyon seviyesinin, hedeflerinden biri olan OLFM4 ekspresyon seviyesini de etkileyerek östrojen ilişkili over kanseri gelişimi ve ilerlemesinde etkin olduğu bildirilirken [152], Mees ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-486-5p'nin ekspresyon artışının pankreas duktal adenokarsinomasının ilerlemesine katkıda bulunduğu vurgulanmaktadır [153]. Çalışmamızda da miR-486-5p'nin artan ekspresyon düzeyinin, OLFM4, CD40 gibi olası hedef molekülleri etkileyerek, çalışmalarda da belirtildiği üzere over kanseri gelişiminde etkin olduğu görülmektedir.

Yoo ve ark. yaptıkları çalışmada miR-5739'un, insan embriyonik kök hücrelerinden elde edilen endotel hücrelerinde farklılaşma potansiyelinden sorumlu olduğu bulunmuştur [154]. Çalışmamızda artan miR-5739 ifade düzeyinin, PLXDC1, DLX6, CD207 olası hedef moleküllerini etkileyerek hücre farklılaşmasını ve hücre iletişim ağının regülasyonuna ve over kanserine yol açtığı düşünülmektedir.

Latchana ve ark. yaptıkları çalışmada ise Spitzoid melanom tümörlerinin tanısal değerlendirmesi için global miRNA profillemesi yapılmış ve Juvenile melanomada artmış miR-1260a ifadesi saptanırken [155], Liu ve ark. yaptıkları çalışmada ise kolorektal kanser tümör dokusunda, miR-1260b ifade düzeyinin artışının, lenf nodu metastazı ve venöz invazyon ile ilişkili olduğu, bu sayede kolorektal kanserde potansiyel prognostik biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği vurgulanmaktadır [156]. Xu ve ark. yaptıkları çalışmada artan miR-1260b ifade düzeyinin küçük hücreli dışı akciğer kanserinde lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu [157], Hirata ve ark. yaptıkları çalışmada ise onkogenik aktivitesi de olduğu saptanan miR-1260b'nin, Wnt sinyal yolağını etkileyerek böbrek kanserinin oluşumunda hücre çoğalması ve invazyonunu sağladığı bildirilmektedir [158]. Tüm bu çalışmalarla korele olarak çalışmamızda da artan miR-1260a ve miR-1260b'nin ifade düzeyinin, SMAD4, RPS27 gibi olası hedef molekülleri etkileyerek, over kanseri gelişiminde hücre çoğalmasını ve metastaz yollarındaki proteinlerin regülasyonu ile hücre invazyonunu sağladığı düşünülmektedir.

Wu ve ark. yaptıkları çalışmada artan miR-17-5p ifade düzeyinin, gastrik kanser hücrelerinde SOCS6'yı hedefleyerek proliferasyonu arttırdığı [159], Li ve ark. yaptıkları çalışmada over kanseri hücre hatlarında (ES-2 ve OVCAR3) hücre döngüsünün G1/S geçişini teşvik edip, apoptozu baskılayarak hücre proliferasyonunu arttırdığı bildirilirken [160], Fang ve ark yaptıkları çalışmada ise over kanser hücrelerinin hayatta kalma oranının, miR-17-5p'nin aşırı ekspresyonundan sonra arttığı, kanser hücrelerinde apoptoz oranını yüksek oranda azalttığı ve hedeflerinden olan PTEN'in aktivitesini azaltarak, AKT yolağını aktive ettiği gösterilmiştir [161]. Çalışmamızda da artan miR-17-5p ifade düzeyinin STAT3, PTEN, CDKN1A ve E2F1

gibi olası hedef molekülleri etkileyerek over kanseri oluşumunda hücre döngüsü geçişlerini hızlandırdığı ve hücre proliferasyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Tian ve ark. yaptığı çalışmada miR-181b-5p'nin küçük hücreli dışı akciğer kanseri serum ve tümör doku örneklerinde artan ifade düzeyinin bulunduğu, hastalığın erken tanısı için olası biyolojik belirteç olabileceği [162], Zhi ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise miR-181b-5p'nin ifade düzeyinin akut miyeloid lösemi hastalarının serum örneklerinde belirgin şekilde yükseldiği ve miR-181b-5p'nin ifade düzeyinin hastalıkla ilgili sağkalımın belirlenmesinde önemli ölçüde potansiyel bir prognostik faktör olarak kullanılabilecek biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir [163]. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada hepatosellüler kanserde artan miR-26b-5p ekspresyon seviyesinin hücre çoğalması, anjiyogenez ve apoptozun düzenlenmesinde etkili olduğu vurgulanmıştır [164]. Sand ve ark. yaptığı çalışmada miR-4281 ifade düzeyinin özellikle malign melanoma dokularında arttığı, Hamam ve ark. yaptıkları çalışmada ise evre I-IV arası meme kanseri hastalarında miR-4281 ifade düzeyinin artış gösterdiği tespit edilmiştir [165, 166]. Komina ve ark. yaptıkları çalışmada ise artan miR-4286 ifade düzeyinin melanoma hücrelerinde proliferasyon ve apoptozise aracılık ettiği belirtilmektedir [167]. Huang ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-5100'un artmış ifade düzeyinin, Rab6'yı hedef alarak akciğer kanserinde tümör büyümesini teşvik ettiği bildirilmiştir [168]. Bizim çalışmamızda da yukarıda adı geçen (miR-181b-5p, miR-26b-5p, miR-4281, miR-4286 ve miR-5100), bu miRNA'ların ifade düzeyinin arttığı tespit edildi. Artan ifade düzeyinin tümör baskılayıcı genler ve hücre farklılaşmasında görev alan birçok hedefleri olduğu göz önüne alındığında, bu miRNA'ların over kanserinin gelişiminde rol aldığını ve çalışmalarla korele olarak hem hastalığın erken tanısında hem de potansiyel bir prognostik faktör olarak değerlendirilebilecekleri düşünülmektedir.

Bignotti ve ark. yaptıkları çalışmada yüksek dereceli seröz over karsinom dokusunun ayırt edilmesinde let-7a-5p'nin yardımcı olabileceği vurgulanmaktadır [169]. Xu ve ark. yaptıkları çalışmada ise aynı miRNA ailesinden let-7b-5p'nin artan ifade düzeyinin multipl miyelomada IGF1R'yi hedefini etkileyerek proliferasyonu ve apoptozu düzenlediği belirtilmektedir [170]. Bizim çalışmamızda da artan let-7a-5p ve

let-7b-5p ifade düzeyinin epitelyal over kanseri dokularının ayırt edilmesinde ve tanımlanmasında kullanılabileceği düşünülmektedir.

Petrillo ve ark. yaptıkları çalışmada seröz over kanseri tümörlerinde, artan miR-181a-5p ifade düzeyinin, genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım sürelerini kısalttığı belirtilmiş, ayrıca tümör boyutunu arttırdığı ve neo-adjuvan kemoterapiye cevap verme oranını düşürdüğü vurgulanmıştır [171]. Parikh ve ark. yaptıkları çalışmada ise miRNA-181a'nın over kanseri progresyonunda, epitelyal mezenkimal geçişin düzenlenmesinde kritik bir role sahip olduğunu, TGF- β yolağını aktive ederek epitelyal-mezenkimal geçişi hızlandığı bulunmuştur [172]. Mi ve ark. yaptıkları çalışmada ise gastrik kanserlerde artan miR-181a-5p ifade düzeyinin hücre çoğalması, koloni oluşumu ile ilişkili olduğu, hücre döngüsü geçişlerini hızlandığı ve RASSF6 hedefini etkileyerek RASSF6 aracılı MAPK sinyal yolağını aktive ettiği, bunun sonucu olarakta epitelyal tümör hücrelerinin mezenkimal geçişini hızlandırarak metastazı desteklediğinin üzerinde durulmuştur [173]. Tamamlanan tez çalışmasında tüm bu çalışmalarla paralel olarak, artan miR-181a-5p ifade düzeyinin olası hedef molekülleri BRCA1, MAPK, CDKN1B, ATM'yi etkileyerek over kanseri oluşumunda önemli rol oynadığı, epitelyal mezenkimal geçişi aktive ederek invazyon ve metastazı hızlandığı düşünülmektedir.

Wang ve ark. yaptıkları çalışmada miR-197-3p'nin artan ifade düzeyinin, mesane kanserinde hücre invazyonu ve metastazı desteklediği gösterilmiş ve daha ileri bir bulgu olarak *LINC00312* geninin miR-197-3p'nin ekspresyonunu azalttığı ve buna bağlı olarak hücre migrasyonunu ve invazyonu inhibe ettiği bulunmuştur [174]. Liu ve ark. yaptıkları çalışmada ise aynı durumun tiroid kanseri içinde geçerli olduğu bildirilmiştir [175]. Çalışmamızda artan miR-197-3p'nin ifade düzeyinin, over kanserinde hücre invazyon ve migrasyon yeteneğini arttırabileceği düşünülmektedir. Ayrıca over kanser hasta grubunda *LINC00312* ekspresyon artışının da miR-197-3p ile birlikte incelenmesinin gerektiği ve ileriki çalışmalarda bunun incelenmesi sonucuna varılmıştır.

Baez-Vega ve ark. miRNA-21 ailesinin çoğu kanserde yüksek oranda eksprese edildiğini bildirmiş ve miRNA-21 ailesini tümör oluşumu ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca over kanserinin başlangıcı, progresyonu ve kemoterapiye direncinde de miRNA-21 ailesinin merkezi bir rol oynadığını belirtmişlerdir [176].

Kao ve ark. yaptıkları çalışmada ise cerrahi ile mide tümörünün çıkarılmasının ardından, mide kanserinde artan miR-21-5p ifade düzeyinin düştüğü tespit edilmiştir [177]. Fang ve ark. yaptıkları çalışma da miRNA-223-3p ifade düzeyinin pankreas, over ve gastrik kanserlerinin tümör dokularında, normal dokuya kıyasla yüksek oranda ifade edildiği ve hücrelerin invazyon yeteneklerini, miRNA-223-3p aracılı SOX11'in ekspresyonunu düzenleyerek arttırdığı gösterilmiştir [178]. Wen ve ark yaptıkları çalışmada ise miR-23a-3p inhibe edilerek prostat kanserinde epitelial-mezenkimal geçişin bastırıldığı gösterilmiştir [179]. Liang ve ark. yaptıkları çalışmada miR-27a-3p'nin artan ifade düzeyinin, RXR α aracılığıyla Wnt- β -katenin yolağını düzenleyerek kolorektal kanser progresyonuna yol açtığı bildirilmiştir [180]. Zhou ve ark. yaptıkları çalışmada ise gastrik kanserlerde miR-27a-3p'nin artan ifade düzeyinin, hücre döngüsü G1/S fazı geçişlerinde etkin rol oynayan BTG2 hedefini etkilediği ve apoptozu baskılayarak onkogenik etki gösterdiği, kanser hücresi çoğalmasını ve in vivo tümör büyümesini belirgin şekilde arttırdığı bulunmuştur [181]. Çalışmamızda yukarıda adı geçen (miR-21-5p, miRNA-223-3p, miR-23a-3p ve miR-27a-3p) bu miRNA'ların ifade düzeyinin arttığı tespit edildi. Artan ifade düzeyinin diğer çalışmalarda olduğu gibi over kanserinde de hücre çoğalmasını ve invazyonunu teşvik edebileceği düşünülmektedir.

Gao ve ark. yaptıkları çalışmada Çin'in Uygur bölgesinde yaşayan, Uygur popülasyonunda HPV ile enfekte olan ve HPV ilişkili serviks kanseri olan kişilerde miR-3653'ün ekspresyon seviyelerinin sağlıklı ve enfeksiyon taşımayan kişilere göre yüksek oranda arttığı bulunmuştur [182]. Lin ve ark. yaptıkları çalışmada ise akciğer adenokarsinomunun progresyonu, klinik seyri ve nüksüz sağkalımı açısından miR-3653'ün prognostik bir belirteç olabileceği üzerinde durulmaktadır [183]. miR-3653 yeni keşfedilen miRNA'lardan olduğundan, hakkında literatürde de az sayıda makale bulunmaktadır. Çalışmamızda da artan miR-3653 ifade düzeyinin epitelial over kanseri gelişimindeki rolünü belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada miR-425-5p ifade düzeyinin gastrik kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve gastrik kanser hücre invazyonunu ve metastazı teşvik edebileceği vurgulanmışlardır. Ayrıca tümör patolojik evrelendirilmesi ile ilgili prognostik faktör olabileceği ifade edilmiştir. [184].

Sun ve ark. yaptıkları çalışmada ise servikal kanser hastalarında, tümör dokuya komşu sağlıklı dokulara oranla tümör dokularında ve serum örneklerinde miR-425-5p ekspresyon seviyesinin belirgin şekilde arttığı raporlanmıştır. Artan miR-425-5p ekspresyon düzeyi ile yüksek tümör evresi ve pozitif lenf nodu metastazı arasında anlamlı bir ilişki olduğu, miR-425-5p'nin servikal kanserler için potansiyel bir prognostik biyobelirteç görevi görebileceği bildirilmiştir [185]. Yaptığımız çalışmada da miR-425-5p ifade düzeyinin arttığı, bu nedenle gastrik kanserine benzer epitelyal over kanserinde de hücre invazyonunu ve metastazı teşvik edebileceği ve epitelyal over kanseri açısından önemli bir biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

Wu ve ark. yaptıkları çalışmada miR-572'nin PPP2R2C ekspresyonunu baskılayarak over kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olduğu tespit edilmiş, over kanseri hücre hatlarında ve dokularında miR-572 ifade düzeyinin arttığı ve bu artışın hücre çoğalmasını uyardığı, ekspresyon kaybının ise hücre çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur [186]. Zhang ve ark. hem over kanseri hücre hatlarında hem de dokularında yaptıkları çalışmada ise miR-572 artan ekspresyon düzeyinin transkripsiyonel olarak SOCS1 ve p21'i baskıladığı ve over kanseri progresyonuna katkıda bulunduğu tespit edilmiştir [187]. Tez çalışmasında da miR-572 ifade düzeyinin artışına ilişkin bulgular over kanseri gelişiminde miR-572'nin rolünü destekler niteliktedir.

Ma ve ark. yaptıkları çalışmada, servikal kanser tümör dokusunda miR-574-5p ekspresyon düzeyinin arttığı, Qki(pan-Qki) ve Qki-5 haberci ribonükleik asit(Qki-5 mRNA) ekspresyon düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir [188]. Ji ve ark. tarafından kolorektal kanser dokularının incelendiği çalışmada ise miR-574-5p'nin ifade düzeyinin anlamlı bir şekilde arttığı, Qki'nin ekspresyonuyla negatif, β -Katenin'in ekspresyonuyla korelasyon gösterdiği, buna bağlı olarak da kanser hücrelerinin proliferasyonu, migrasyon ve invazyon yeteneğinin arttırdığı, hücre farklılaşması ve hücre döngüsünün kontrolünün baskıladığı rapor edilmiştir [189]. Yapılan tez çalışmasında miR-574-5p'nin ifade düzeyinin artış gösterdiği saptanmıştır. Söz konusu miRNA'nın da yukarıda bildirilen moleküller üzerinden over kanserine yol açabileceği düşünülmektedir.

Yoo ve ark. yaptıkları çalışmada insan embriyonik kök hücrelerinin endotel hücrelerine farklılaşması sırasında miR-7641'in ekspresyon düzeyinin azaldığı

bulunmuştur [190]. Çalışmamızda artan miR-7641 ifade düzeyinin over kanserinde hücre farklılaşmasını engelleyerek, hücrelerin sürekli proliferasyona uğramasına neden olduğu düşünülmektedir.

Niu ve ark. yaptıkları çalışmada ise Hepatit C virüsü sebebi ile gelişen karaciğer fibrozisinde, miR-1273g-3p'nin artan ifade düzeyinin, PTEN'i doğrudan etkileyerek, yağ depolayan(hepatik stellat) hücrelerinin aktivasyonunu, çoğalmasını aşırı düzeyde arttırdığı ve apoptozu engellediği, aynı zamanda karaciğerdeki fibroz düzeyi ile doğrudan ilişkili olduğu bildirilmiştir [191]. Çalışmamızda da artan miR-1273g-3p ifade düzeyinin hedefi olan PTEN'i etkileyerek epitelyal over kanserine yatkınlık sağlayabileceği düşünülmektedir.

Jin ve ark. yaptıkları çalışmada miR-1305'in hücre döngüsü fazları arasındaki geçişlerde, en yüksek düzeyde ifade değişimi gösteren miRNA olduğunu tespit etmişler. Yüksek oranda artan ekspresyonunun pluripotent kök hücrelerinin farklılaşmasına yol açtığı, hücre döngüsü G₁/S geçişini hızlandığı bulunmuş, bunun aksine ekspresyonunun düşmesinin ise tam tersine etki yaptığı, direkt hedefinin pluripotent faktörü POLR3G olduğu ve bu genin 3'UTR'sine bağlanmasıyla pluripotent hücrenin farklılaşmasını ve hücre sağkalımını kontrol ettiği ileri sürülmüştür [192]. Çalışmamızda da artan miR-1305 ifade düzeyinin, hücre döngüsü G₁/S geçişini hızlandığı hipotezine uygun olarak epitelyal over kanserine yatkınlık ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Ries ve ark. tarafından yapılan çalışmada periferik kan örneklerinden elde edilen verilere göre miR-3651'in oral skuamöz hücreli karsinom için olası biyolojik belirteç olabileceği, artan miR-3651 ifade düzeyinin lenf nodu tutulumu, tümör derecesi ve klinik evre ile arasında anlamlı korelasyonlar gösterildiği bulunmuştur [193]. Wang ve ark. yaptıkları çalışmada ise bizim bulgularımızın ve diğer çalışmaların aksine miR-3651 ekspresyonunun komşu sağlıklı dokulara kıyasla özofagus skuamöz hücreli tümör dokularında önemli ölçüde ekspresyon düzeyinin azaldığı bildirilmektedir [194]. Aslında bu hipotezlerin hepsi miRNA'ların her hücre tipi ve kanser tipinde farklı molekülleri hedefledikleri ve farklı ekspresyon modeli göstererek değişik fonksiyonlara sahip olduklarını kanıtlar niteliktedirler. Çalışmamızda, bireyler arası ve gruplar arası karşılaştırma ve analizler sonrası *BRCA1* genindeki mutasyon taşıyıcılığı ve buna bağlı olarak over kanseri oluşumu ile ilgili

istatistiksel olarak anlamlı, ekspresyon seviyesi azalan miRNA'lar bulundu. Çalışmamızda ekspresyonun azalan miR-126-3'ün, Fiala ve ark. yaptıkları çalışmada anjiyogenez, tümör büyümesi, invazyon ve vasküler inflamasyonda önemli rolleri olduğu bulunmuş, düşük ekspresyon profilinin metastatik kolorektal kanserinde prognozsuz sağkalımın ve genel sağkalımın süresini çok daha kısalttığı öne sürülmektedir [195]. Xiong ve ark. yaptıkları çalışmada ise tiroid kanseri hücrelerinde miR-126-3'ün ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olduğunu tespit edilmiş, aksine miR-126-3p'nin aşın ifadesinin ise, hem in vitro hem de in vivo tiroid kanseri hücresi çoğalmasını ve koloni oluşumunu, hücresel migrasyonu ve VEGF sekresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir [196]. Guo ve ark. yaptıkları çalışmada da miR-126-3p'nin tümör dokularında ekspresyonunun düştüğü, Meister ve ark. yaptıkları çalışma sonucu ise miR-126-3p'nin genellikle normal fonksiyon olarak tümör baskılayıcı görevi olduğunu ileri sürmektedirler [197, 198]. Çalışmamızda da miR-126-3p'nin düşük ifade düzeyinin over kanserinde hücre çoğalmasını ve migrasyonunu teşvik ettiği düşünülmektedir.

Wang ve ark. yaptıkları çalışmada miR-320a'nın küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, hücre proliferasyonunu azalttığı ve doğrudan insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörüne bağlanarak tümör hücre büyümesini ve invazyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Tümör oluşumu ve tümör progresyonu sırasında ekspresyonu azalan miR-320a'nın potansiyel olarak tümör baskılayıcı genleri ve onkogenleri hedefleyebileceği ve bu genlerin ekspresyonlarını bu doğrultuda azaltıp arttırabileceği de vurgulanmıştır [199]. Xishan ve ark. yaptıkları çalışmada ise miRNA-320a ifadesinin, kronik miyeloid lösemide *BCR/ABL* onkogenini hedefleyerek normal fonksiyon olarak tümör baskılayıcı görevinde olduğu vurgulanmaktadır [200]. Tez çalışmasında da miR-320a'nın azalan ifade düzeyinin MCL1, BANP, BMI1 gibi olası hedef moleküllerini etkileyerek, hücrelerin çoğalmasına ve sağkalımına, metastaza ve ilaç direncine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda ekspresyon seviyeleri düşük bulunan miR-320 ailesinin üyeleri; miR-320b, miR-320c, miR-320d ve miR-320e'nin hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi bulunan ve sıklıkla kolorektal adenoma ve submukozal invaziv karsinoma dokularında ekspresyonu azalan miRNA'lar olduğu, Tadano ve ark. tarafından yapılan çalışmada belirtilmektedir.

Ayrıca miR-320 ailesinin normal fonksiyon olarak CDK6 hedefini etkileyerek tümör çoğalmasını baskıladığı vurgulanmış, aksine düşük ekspresyon düzeyinin kolorektal tümörlerin büyümesinde önemli bir rol oynayabileceği, bu sayede kolorektal tümörlerin erken teşhisi için bir biyolojik belirteç olarak düşünülebileceği vurgulanmaktadır [201]. Vishnubalaji ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-320 ailesine ait genlerin aşırı ekspresyonunun HCT 116 kolorektal kanser hücre hattı modeli üzerinde hücre büyümesi ve migrasyonunu azalttığı, normal fonksiyon olarak tümör baskılayıcı etki gösterdiği ve bu fonksiyonunu kolorektal kanserde SOX4, FOXM1 ve FOXQ1'i hedeflerini regüle ederek yaptığı belirtilmiştir [202]. Gu ve ark. ile Kratz ve ark. yaptıkları ayrı çalışmalarda ise ekspresyon düzeyi düşük bulunan miR-320 ailesinin over kanseri oluşumunda SYNCRIP, BCL9L, FBXO28 ve ARF1 gibi hedefleri regüle ederek, PI3K ve Wnt/ β -Katenin sinyal yollarının bozulmasına yol açtığı, hücre proliferasyonu ile mitozu ve Topoizomerez II α -bağlı DNA çözme işlemini hızlandırdığı belirtilmektedir [203-205]. Çalışmamızda da ekspresyon düzeyi düşük bulunan miR-320 ailesinin yukarıda adı geçen (SYNCRIP, BCL9L, FBXO28 ve ARF1) olası hedef moleküllerini etkileyerek PI3K ve Wnt/ β -Katenin sinyal yollarının bozulmasına ve epitelyal over kanseri oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Liu ve ark. tarafından yapılan çalışmada miR-324-3p'nin ekspresyon artışının WNT2B hedefini etkileyerek hücre migrasyonunu baskıladığı gösterilirken, nazofarenks karsinomunda miR-324-3p ekspresyon düzeyinin azaldığı WNT2B'nin yeniden düzenleme sonucu kanser oluşumunda rol aldığı ileri sürülmüştür [206]. Kuo ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-324 ailesinin ekspresyon artışının, meme kanserinde hücrelerin büyümesini ve invazyonunu baskıladığı, kolorektal kanserlerde ise hücre proliferasyonu baskıladığı bildirilmiştir [207]. Bizim çalışmamızda saptanan miR-324-3p ekspresyon düşüklüğünün *WNT2B*, *WNT9B*, *DVL2* gibi hedefleri etkileyerek *BRCA1* ilişkili over kanser oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Matamala ve ark. yaptıkları çalışmada miR-3656 ifade düzeyinin meme tümörlerinde azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada bazı hastaların tedavi sonrası plazma miR-3656 ifade düzeyinin daha da düştüğü belirtilmiştir [208]. Bizim çalışmamızda da meme tümörlerinde yapılan çalışmayla korele olarak miR-3656 ifade düzeyinin düştüğü bulundu.

Yang ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise miR-4284'ün ekspresyon artışının insan glioblastoma kanser kök hücrelerinde JNK/AP-1 sinyalizasyonunu da düzenleyerek hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu indüklediği vurgulanmıştır [209]. Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise miR-4284'ün ekspresyonun azalması, servikal kanserlerde hedeflerinden biri olan TRIB3'ün ifadesinin artışına, bir diğer hedefi olan HNRNPA1'inde aşırı üretimine neden olarak kansere sebep olduğu düşünülmektedir [210]. Çalışmamızda da ifade düzeyi azalan miR-4284'ün servikal kanserlerde olduğu gibi HNRNPA1'in aşırı üretimine neden olarak epitelyal over kanseri oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Chowdhari ve ark. yaptıkları çalışmada artan miR-4516 ifade düzeyinin hedef molekülü olan STAT3'ün regülasyonunu azalttığı ve bu molekülün hedefi olan vasküler endotelyal büyüme faktörünün azalmasına yol açtığı ifade edilmektedir [211]. Çalışmamızda ise miR-4516 ifade düzeyinin düştüğü, bu düşüşünde teorikte yukarıdaki çalışmayla korele olarak STAT3'ün regülasyonunu arttırdığı düşünüldüğünde, STAT3'ün, vasküler endotelyal büyüme faktörünün artışına yol açarak overin malign dönüşümüne katkı sağladığı düşünülmektedir.

Liu ve ark. yaptıkları çalışmada ise cerrahi olarak çıkarılamayan karaciğer tümörlerine uygulanan kemoembolizasyon tedavisi sonrası, miR-4741'in ifade düzeyinin arttığı bu artışında tedaviye yanıtla doğru orantılı olarak bulunduğu bildirilmiştir [212]. Çalışmamızda ifade düzeyi azalan miR-4741'in, over kanserli hastaların tedavi öncesi ve sonrası plazma düzeyine bakılmasının yukarıdaki çalışmayla korele olarak tedaviye yanıt açısından değerlendirilebileceği fikrini oluşturmaktadır.

Hu ve ark. yaptıkları çalışmada miR-484'ün, servikal kanser hücrelerinde ZEB1 ve SMAD2'yi hedefleyerek proliferasyonu ve epitelyal mezenkimal geçişi baskıladığı, serviks kanseri için potansiyel biyolojik belirteç olabileceği ve tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü ileri sürülmektedir [213]. Lu ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-484 ekspresyon düzeyinin kolorektal kanserlerde evre ilerledikçe aşırı derecede düştüğü saptanmış, miR-484-5p ve miR-484 ifade düzeyinin kolorektal kanserlerin erken tanı ve izlenmesinde kullanılabilecek yararlı bir belirteç olabileceği vurgulanmıştır [214]. Diğer çalışmalarla korele olarak çalışmamızda da miR-484 azalan ifade düzeyinin, servikal kanserlerde olduğu gibi hedef molekülleri olan ZEB1

ve SMAD2'yi hedefleyerek, kanser hücrelerinin proliferasyonu desteklediği düşünülmektedir.

Guo ve ark. yaptıkları çalışmada miR-564'ün aşırı ekspresyonunun, gastrik kanser hücrelerinde E2F3'ün mRNA ve protein düzeyini önemli ölçüde inhibe ettiği ve anti miR-564 tedavisinin gastrik kanser gelişiminde önemli bir potansiyel tümör baskılayıcı gen olabileceği belirtilmektedir [215]. Mutlu ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-564'ün doğrudan AKT2, GNA12, GYS1 ve SRF moleküllerini içeren bir ağı etkileyerek PI3K ve MAPK yollarının bir çift inhibitörü olarak görev yaptığı ve hücre döngüsü G1 fazında durdurarak meme kanserinde proliferasyonu ve invazyonu engellediği, miR-564'ün aşırı ekspresyonunun epitelyal mezenkimal geçişe engel olduğu ve agresif meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür [216]. Yang ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-564'ün akciğer kanser hücresinin çoğalmasını, hücre döngüsünün ilerlemesini, migrasyonunu ve invazyonunu engellediği, miR-564 ekspresyonunun ZIC3 proteini ile negatif olarak korele olduğu, düşük miR-564 ifade düzeyinin ve yüksek ZIC3 ekspresyonunun, tümör evresi ve prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır [217]. Bizim çalışmamızda da ekspresyon seviyesi azalan miR-564'ün tümör baskılayıcı fonksiyonunu yerine getiremediği ve hücre döngüsüne müdahil olamadığı düşünülmektedir.

Zheng ve ark. yaptıkları çalışmada miR-1225-5p gastrik kanser gelişimi ve ilerlemesinde tümör baskılayıcı olarak değerlendirmişler, miR-1225-5p'nin düşük ekspresyon düzeyinin gastrik kanserlerde sıklıkla tespit edilmiş, agresif fenotip ve kötü prognoz ile kuvvetli korelasyon gösterdiği belirtmişlerdir. Deneysel olarak, miR-1225-5p'nin aşırı ifade düzeyinin, hücre proliferasyonu, koloni oluşumu, in vitro invazyon, farelerde tümör büyümesi ve metastazı baskılayabileceği bulunmuştur. [218]. Li ve ark. yaptıkları çalışmada ise sağlıklı servikal dokularına kıyasla, servikal kanser dokularında miR-142-3p ekspresyon seviyesinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiş, düşük miR-142-3p ekspresyon düzeyinin ileri tümör evresi, lenf nodu metastazı ve servikal invazyon ile anlamlı olarak ilişkili olduğu bildirilmiştir [219]. Wu ve ark. yaptıkları çalışmada benzer şekilde, miR-142-3p artan ifade düzeyinin, hepatosellüler kanser dokularında tümör progresyonunu ve invazyonunu inhibe edebileceğini göstermişlerdir. [220]. Çalışmamızda da azalan miR-1225-5p, miR-142-3p ifade düzeyinin, epitelyal over kanserinde hücre çoğalması ve invazyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Guo ve ark. yaptıkları çalışmada miR-26a-5p'nin ekspresyon kaybının, negatif olarak SERBP1 düzenleyerek prostat kanserinde proliferasyonu, migrasyonu arttırdığı, metastaz ve kötü prognoz ile anlamlı derecede ilişkili olduğu bulunmuştur [221]. Miyamoto ve ark. yaptıkları çalışmada ise tümör baskılayıcı fonksiyonu bulunan miRNA-26a-5p'nin artan ekspresyonunun mesane kanserinde PLOD2 düzenleyerek hücrenin migrasyon ve invazyon yeteneğini inhibe ettiği bildirilmiştir. [222]. Çalışmamızda da azalan miRNA-26a-5p ekspresyon seviyelerinin, yukarıdaki çalışmada ifade edildiği üzere mesane kanserindeki tümör baskılayıcı fonksiyonu yerine getiremeyerek, hücre çoğalması ve over kanserinin ilerlemesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada servikal kanserlerin tanısında invaziv olmayan yeni biyolojik belirteç olarak serumda miR-2861 düzeyinin kullanılabileceği ileri sürülmektedir [223]. Xu ve ark. yaptıkları çalışmada ise, miR-2861 ekspresyon artışının, insan papilloma virüsü tarafından indüklenen servikal kanserlerde EGFR/AKT2/CCND1 yolaklarını hedefleyerek tümör baskılayıcı görevi gördüğü, hücre çoğalmasını ve invazyonunu baskıladığı vurgulanmakta, aksine ekspresyon düşüklüğünün ise ileri tümör evresi ve lenf nodu metastazı ile korelasyon gösterdiği belirtilmektedir [224]. Çalışmamızda azalan miR-2861 ifade düzeyinin, epitelyal over kanserinde de, servikal kanserlerde ifade edilene benzer EGFR/AKT2/CCND1 yolaklarını hedeflediği düşünülmektedir.

Gao ve ark. yaptıkları çalışmada miR-342-3p'nin hepatosellüler karsinom dokularında ekspresyonunun düştüğü ve prognostik önemi belirtilmiştir [225]. Li ve ark. yaptıkları çalışmada servikal kanserlerde miR-342-3p ekspresyonunun düzeyinin düştüğü bulunmuş, aksine fonksiyonel olarak miR-342-3p'nin ekspresyon artışının ise servikal kanserlerde FOXM1'i hedefleyerek proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu baskıladığını gösterilmiştir [226]. Xie ve ark. yaptıkları bir diğer çalışmada ise miR-342-3p'nin fonksiyonel olarak akciğer kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı, tümör baskılama rolünü de RAP2B'nin regülasyonunu düzenleyerek gerçekleştirdiği bulunmuştur [227]. Çalışmamızda da azalan miR-342-3p ifade düzeyinin, over kanserinin oluşumunda ve seyrinde rol aldığı, ayrıca miR-342-3p'nin ifade düzeyinin azalmasının yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği üzere hastalığın klinik seyri ile korele olabileceği düşünülmektedir.

Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada azalan miR-4530'un ifade düzeyinin, hedefi olan VASH1'in ekspresyonunu baskılayarak meme kanseri hücre hattında anjiyogenezi teşvik ettiği, aksine ekspresyon artışının ise hücre proliferasyonu ve koloni oluşumunu engellediği ve apoptozu indüklediği bulunmuştur [228]. Liu ve ark. yaptıkları hayvan çalışmalarında ise, normal farelerle karşılaştırıldığında tümör taşıyan farelerin plazma düzeyinde miR-494-3p'nin ifade düzeyinin yüksek oranlarda düştüğü tespit edilmiştir [229]. Çalışmamızda da azalan miR-4530 ve miR-494-3p ifade düzeyinin, over kanserinin oluşumu ve hücre proliferasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Yan ve ark. yaptıkları bir çalışmada kolorektal kanserinde, dolaşımdaki eksozom kapsüllü miRNA'ları araştırmış, miR-5787'nin ekspresyonunun kolorektal kanserinde yüksek oranda düştüğü ve ayrıca miR-5787'nin glikoz metabolizmasını hedefleyerek düzenleyebildiği, böylece kolorektal tümör oluşumunda ve tümör ilerlemesinde kritik rol oynadığı belirtilmiştir [230]. Çalışmamızda da azalan miR-5787'nin ifade düzeyinin over kanseri oluşumunda da benzer glikoz metabolizmasını hedefleyebileceği, ileriki çalışmalarda bunun değerlendirilmesi gerektiği öngörülmektedir.

Zhang ve ark. yaptıkları bir çalışmada azalan miR-638 ifade düzeyinin, hepatosellüler kanser dokularında ve hücre hattında SOX2'yi hedefleyerek invazyona ve epitelyal-mezenkimal geçişe yardımcı olduğu belirtilmekte, miR-638'in ekspresyon artışının ise hücre migrasyonunu ve invazyonu inhibe ettiği vurgulanmaktadır [231]. Zhang ve ark. yaptıkları bir diğer çalışmada ise miRNA-638 ekspresyon artışının insan kolorektal karsinomasında Tetraspanin1'i hedefleyerek hücre proliferasyonunu, invazyonunu ve hücre döngüsünü engellediği, aksine ekspresyon kaybının ise kolorektal kanser hücresi çoğalmasını, invazyonunu teşvik ettiği ve hücre döngüsünde G1/S geçişini hızlandırdığı belirtilmektedir [232]. Tan ve ark. yaptığı çalışmada ise, miR-638'in meme kanserinde en çok ifade düzeyi düşen miRNA'lardan biri olduğu bildirilmiş, ayrıca miR-638'in doğrudan *BRCA1*'i hedeflediği ortaya çıkarılmıştır. Bu bulgular ile miR-638'in ekspresyon kaybının triple-negatif meme kanseri progresyonunda *BRCA1* düzenini bozarak önemli bir rol oynadığını, bu nedenle, miR-638'in meme kanseri için potansiyel bir prognostik biyolojik belirteç ve terapötik hedef görevi yapabileceği belirtilmektedir [233]. Tamamlanan tez çalışmasında *BRCA1* mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkili olan epitelyal over kanserinde miR-638'in

ekspresyon kaybının saptanmış olması, *BRCAl* ve miR-638 arasındaki ilişkinin bozulmasının triple negatif meme kanserine benzer şekilde epitelyal over kanserinin gelişiminde de etkili olduğunu düşünülmektedir.

Langhe ve ark. yaptıkları çalışmada benign ve malign over hastalıklarını ayırt etmek için yeni bir serum miRNA paneli çalışılmış ve let-7i-5p miRNA'sının ifade düzeyinin over kanseri hastalarında yüksek oranda düştüğü tespit edilmiştir. Ekspresyonu azalan let-7i-5p'nin hedefleri arasında AKT/mTOR gibi sinyal yollarının olduğu, over kanserinde let-7i-5p'nin tanısal biyolojik belirteç olarak nitelendirilebileceği ileri sürülmektedir [234]. Literatürdeki çalışmayla korele olarak let-7i-5p ekspresyon kaybının over kanserinde biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği bir kez de tarafımızdan teyit edilmiş ve daha büyük örnekleme araştırılması gereken miRNA'lar arasına alınması planlanmıştır.

Qin ve ark. yaptıkları çalışmada miRNA-125a-5p'nin insan servikal karsinom proliferasyonunu ve migrasyonunu ABL2'yi hedefleyerek kontrol ettiği bulunmuş, servikal kanser tümör dokularında ve hücre hatlarında miRNA-125a-5p'nin ekspresyonunun yüksek oranda düştüğü tespit edilmiştir. miR-125a-5p ekspresyon düzeyi artışının, in vitro olarak kanser proliferasyonunu ve migrasyonunu, in vivo olarak servikal kanser metastazını inhibe ettiği belirtilmiştir. ABL2'nin doğrudan miR-125a-5p tarafından hedeflendiği gösterilmiş olup, servikal kanserlerde, *ABL2* geni ve protein düzeyinin miR-125a-5p tarafından düzenlendiği bildirilmiştir [235]. Zhong ve ark. yaptıkları çalışmada da miR-125a-5p'nin doğrudan STAT3'ü hedefleyerek akciğer kanser hücrelerinde bir tümör baskılayıcı olarak rol oynadığı belirtilmiş, miR-125a-5p ekspresyon düzeyinin akciğer kanseri dokularında ve akciğer kanseri hücre hattında önemli ölçüde düştüğü belirtilmiştir. Aksine miR-125a-5p ekspresyon düzeyindeki artışın, hücre canlılığını, proliferasyonunu ve akciğer kanseri hücrelerinin invazyonunu önemli ölçüde azaltabileceği ve akciğer kanseri hücrelerinin apoptozunu artırabileceği vurgulanmaktadır [236]. Çalışmamızda da azalan miR-125a-5p ifade düzeyinin, literatürde belirtilen ABL2 ve STAT3 gibi hedef molekülleri ile etkileşiminin kesilmesi sonucu tümör baskılayıcı etkisini yerine getirememesi sebebi ile kanser oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir.

Xia ve ark. yaptıkları çalışmada ise ZFAS1 RNA'sının miR-150-5p ile etkileşerek, Sp1 ekspresyonunu regüle ettiği ve bu yolla over kanserine yol açtığı

belirtilmiş, aksine miR-150-5p'nin ekspresyon artışının over kanserinde hücre çoğalmasını, migrasyonunu ve invazyonunu engellediği bulunmuştur [237]. Li ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-150-5p'nin aşırı ekspresyonunun hepatosellüler kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonunu, MMP14'ü hedefleyerek inhibe ettiği bildirilmiştir [238]. Çalışmamızda epitelyal over kanserinde miR-150-5p ifade düzeyinin düştüğü saptanmış, söz konusu miRNA'daki bu ekspresyon düşüklüğünün hepatosellüler kanser çalışmalarında belirtildiği şekilde over kanserinde de etkili olduğunu düşünülmektedir.

Chen ve ark. yaptıkları çalışmada miRNA-22-3p'nin hepatosellüler kanserinde ekspresyon düzeyinin düştüğü ve hepatosellüler karsinom gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunduğu belirtilmiştir [239]. Chen ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada ise miR-451a'nın ifade düzeyinin düşüklüğü, akciğer kanserinde patolojik evre, tümör çapı ve lenf nodu metastazı ile ilişkili olduğu ve miR-451a'nın akciğer kanserinde potansiyel bir biyolojik belirteç olabileceği belirtilmiştir [240]. Minna ve ark. yaptıkları çalışmada ise miR-451a'nın ekspresyon artışının papiller tiroid kanser hücre hattının proliferasyonunu ve migrasyonunu bozduğu, hedefleri MIF, c-MYC ve AKT1'in protein seviyelerini düşürdüğü ve AKT/mTOR yolaktivasyonunu zayıflattığı gösterilmiş, fonksiyonel olarak miR-451a'nın tümör baskılayıcı rol oynadığı vurgulanmıştır [241]. Song ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada ise PARP inhibitörü tedavisi sonrası, *BRCA1* mutasyonlu triple negatif meme kanserinde miR-664b-5p ekspresyonunun artırılarak kemoterapiye cevabın arttırıldığı bildirilmiş, fonksiyonel analizler sonrası artan miR-664b-5p ifade düzeyinin *BRCA1* mutasyonlu triple negatif meme kanseri hücrelerinde proliferasyon, migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini gösterilmiş, fonksiyonel olarak miR-664b-5p'nin tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü ve CCNE2'yi hedefleyerek kemoterapi duyarlılığı arttırmak için PARP inhibitörlerinin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğu vurgulanmıştır [242]. Tez çalışmamızda da miRNA-22-3p, miR-451a ve miR-664b-5p'nin ifade düzeyinin düştüğü yukarıdaki çalışmalarda belirtildiği üzere bu miRNA'ların tümör baskılayıcı fonksiyonlarını yerine getiremedikleri ve sonucunda epitelyal over kanseri oluşumundan sorumlu olduklarını düşündürmektedir. Ayrıca over kanseri, *BRCA* mutasyonu taşıyan hastalarda da tedavi seçeneklerinden biri olan PARP

inhibitörlerinin kullanımında miR-664b-5p'nin ifade düzeyini arttırıcı faktörlerin bulunması ve kullanılması gerektiği düşünülmektedir.

Yapılan analizler sonucu gruplar arası farklılık gösteren miRNA'lar belirlendi. Saptanan miRNA'ların bir bölümünün literatürde farklı hastalık gruplarında var olduğu, bir grubunun da over kanser hastalarında veya hücre hatlarında daha önceden gösterildiği anlaşıldı. Tez çalışması sonucu *BRCA1* mutasyonu aracılı over kanser gelişiminde belli miRNA'ların etkili olduğu anlaşıldı. Çalışmada *BRCA1* mutasyon taşıyıcılığı, epitelyal over kanseri ve hastalığa yatkınlık oluşturabilecek, azalan ve artış gösteren toplam 99 miRNA'nın over kanserinde daha büyük gruplarda araştırılması gerektiği sonucuna varıldı. Bundan sonraki çalışmalarda tez çalışmamızda bulduğumuz, farklılık gösteren tüm miRNAlar ailesel, sporadik ve *BRCA* mutasyonu ile ilişkili olan alt gruplarından oluşan yüksek hasta sayılı kohortlarda, sağlıklı popülasyon kontroller ile karşılaştırılarak incelenecektir. Saptanan özellikli bu miRNA'ların, over kanseri açısından potansiyel biyobelirteç olma özelliği bulundurması nedeni ile validasyonlarının yapılması son derece anlamlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ferlay, J., ve ark. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
2. Lalwani, N., ve ark. *Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment*. Radiographics, 2011. **31**(3): p. 625-46.
3. Gultekin, M.,ve Boztas G., *Türkiye Kanser İstatistikleri*. 2014, T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
4. [cited 2012; Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
5. Gilks, C.B. ve J. Prat, *Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances*. Hum Pathol, 2009. **40**(9): p. 1213-23.
6. Chen, V.W., ve ark. *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer, 2003. **97**(10 Suppl): p. 2631-42.
7. Gagnon, A. ve B. Ye, *Discovery and application of protein biomarkers for ovarian cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2008. **20**(1): p. 9-13.
8. Jacobs, I.J. ve U. Menon, *Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(4): p. 355-66.
9. Jacobs, I.J., D.H. Oram, ve R.C. Bast, Jr., *Strategies for improving the specificity of screening for ovarian cancer with tumor-associated antigens CA 125, CA 15-3, and TAG 72.3*. Obstet Gynecol, 1992. **80**(3 Pt 1): p. 396-9.
10. Lewis, B.P., ve ark. *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
11. Alvarez-Garcia, I. ve E.A. Miska, *MicroRNA functions in animal development and human disease*. Development, 2005. **132**(21): p. 4653-62.
12. Calin, G.A., ve ark. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
13. Lewis, B.P., C.B. Burge, ve D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
14. Iorio, M.V., ve ark. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7065-70.
15. Lu, J., ve ark. *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
16. Martini H., F., *Human Anatomy* (7th Edition) ed. 2012: Pearson Benjamin Cummings.
17. Godwin, A.K., J.R. Testa, ve T.C. Hamilton, *The biology of ovarian cancer development*. Cancer, 1993. **71**(2 Suppl): p. 530-6.
18. Lengyel, E., *Ovarian cancer development and metastasis*. Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1053-64.
19. Jemal, A., ve ark. *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.

20. Eisenkop, S.M. ve N.M. Spirtos, *The clinical significance of occult macroscopically positive retroperitoneal nodes in patients with epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2001. **82**(1): p. 143-9.
21. Bristow, R.E., ve ark. *Radical oophorectomy with primary stapled colorectal anastomosis for resection of locally advanced epithelial ovarian cancer*. J Am Coll Surg, 2003. **197**(4): p. 565-74.
22. Bristow, R.E., ve ark. *Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: a meta-analysis*. J Clin Oncol, 2002. **20**(5): p. 1248-59.
23. Winter, W.E., 3rd, ve ark. *Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 2007. **25**(24): p. 3621-7.
24. Armstrong, D.K., ve ark. *Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 34-43.
25. Khalil, I., ve ark. *The potential of biologic network models in understanding the etiopathogenesis of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2010. **116**(2): p. 282-5.
26. Jones, M.B., *Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management*. Clin Obstet Gynecol, 2006. **49**(3): p. 517-25.
27. Bocker, W., [WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. Verh Dtsch Ges Pathol, 2002. **86**: p. 116-9.
28. Reznick RH, H.J., *Cancer of the ovary*. 2007, Cambridge University Press: Cambridge, England.
29. Visintin, I., ve ark. *Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 1065-72.
30. Manne, U., R.G. Srivastava, ve S. Srivastava, *Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment*. Drug Discov Today, 2005. **10**(14): p. 965-76.
31. van der Velde, N.M., ve ark. *Time to stop ovarian cancer screening in BRCA1/2 mutation carriers?* Int J Cancer, 2009. **124**(4): p. 919-23.
32. Kobayashi, H., *Ovarian cancer in endometriosis: epidemiology, natural history, and clinical diagnosis*. Int J Clin Oncol, 2009. **14**(5): p. 378-82.
33. Feeley, K.M. ve M. Wells, *Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy*. Histopathology, 2001. **38**(2): p. 87-95.
34. Auersperg, N., ve ark. *The biology of ovarian cancer*. Semin Oncol, 1998. **25**(3): p. 281-304.
35. Dubeau, L., *The cell of origin of ovarian epithelial tumours*. Lancet Oncol, 2008. **9**(12): p. 1191-7.
36. Mandai, M., ve ark. *Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management*. Int J Clin Oncol, 2009. **14**(5): p. 383-91.
37. Piek, J.M., ve ark. *Women harboring BRCA1/2 germline mutations are at risk for breast and female adnexal carcinoma*. Int J Gynecol Pathol, 2003. **22**(3): p. 315-6; author reply 315-6.
38. Tagliaferri, P., ve ark. *BRCA1/2 genetic background-based therapeutic tailoring of human ovarian cancer: hope or reality?* J Ovarian Res, 2009. **2**: p. 14.
39. Rubin, S.C., *Chemoprevention of hereditary ovarian cancer*. N Engl J Med, 1998. **339**(7): p. 469-71.

40. Ben David, Y., ve ark. *Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors*. J Clin Oncol, 2002. **20**(2): p. 463-6.
41. Prat, J., A. Ribe, ve A. Gallardo, *Hereditary ovarian cancer*. Hum Pathol, 2005. **36**(8): p. 861-70.
42. Boyd, J., *Molecular genetics of hereditary ovarian cancer*. Oncology (Williston Park), 1998. **12**(3): p. 399-406; discussion 409-10, 413.
43. Lynch, H.T., T. Smyrk, ve J. Lynch, *An update of HNPCC (Lynch syndrome)*. Cancer Genet Cytogenet, 1997. **93**(1): p. 84-99.
44. Boyd, J., ve ark. *Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer*. JAMA, 2000. **283**(17): p. 2260-5.
45. Risch, H.A., ve ark. *Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(3): p. 700-10.
46. Foster, K.A., ve ark. *Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(16): p. 3622-5.
47. Reedy, M., ve ark. *Contribution of BRCA1 and BRCA2 to familial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study*. Gynecol Oncol, 2002. **85**(2): p. 255-9.
48. Antoniou, A.C., ve ark. *Risk models for familial ovarian and breast cancer*. Genet Epidemiol, 2000. **18**(2): p. 173-90.
49. Pharoah, P.D. ve B.A. Ponder, *The genetics of ovarian cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2002. **16**(4): p. 449-68.
50. Miki, Y., ve ark. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. Science, 1994. **266**(5182): p. 66-71.
51. Wooster, R., ve ark. *Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 789-92.
52. Tavtigian, S.V., ve ark. *The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 333-7.
53. Scully, R. ve D.M. Livingston, *In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2*. Nature, 2000. **408**(6811): p. 429-32.
54. Scully, R., ve ark. *Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells*. Cell, 1997. **88**(2): p. 265-75.
55. Shinohara, A., H. Ogawa, ve T. Ogawa, *Rad51 protein involved in repair and recombination in S. cerevisiae is a RecA-like protein*. Cell, 1992. **69**(3): p. 457-70.
56. Yoshida, K. ve Y. Miki, *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*. Cancer Sci, 2004. **95**(11): p. 866-71.
57. Phillips, K.A., ve ark. *Frequency of p53 mutations in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 mutations*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(5): p. 469-73.
58. Irminger-Finger, I., B.D. Siegel, ve W.C. Leung, *The functions of breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) product and its associated proteins*. Biol Chem, 1999. **380**(2): p. 117-28.
59. Welsh, P.L., K.N. Owens, ve M.C. King, *Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2*. Trends Genet, 2000. **16**(2): p. 69-74.
60. Somasundaram, K., ve ark. *Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1*. Nature, 1997. **389**(6647): p. 187-90.

61. Harkin, D.P., ve ark. *Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1*. Cell, 1999. **97**(5): p. 575-86.
62. Prat, J., *Pathology of the Ovary*. 1st Edition ed. 2004: Saunders.
63. Puget, N., ve ark. *Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions*. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 455-61.
64. Unger, M.A., ve ark. *Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing*. Am J Hum Genet, 2000. **67**(4): p. 841-50.
65. Casilli, F., ve ark. *Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments*. Hum Mutat, 2002. **20**(3): p. 218-26.
66. Barrois, M., ve ark. *Real-time PCR-based gene dosage assay for detecting BRCA1 rearrangements in breast-ovarian cancer families*. Clin Genet, 2004. **65**(2): p. 131-6.
67. Tancredi, M., ve ark. *Haplotype analysis of BRCA1 gene reveals a new gene rearrangement: characterization of a 19.9 KBP deletion*. Eur J Hum Genet, 2004. **12**(9): p. 775-7.
68. Struwing J.P., ve ark. *The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 198-200.
69. Oddoux, C., ve ark. *The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%*. Nat Genet, 1996. **14**(2): p. 188-90.
70. Gayther, S.A., ve ark. *Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene*. Nat Genet, 1997. **15**(1): p. 103-5.
71. Garcia, A., ve ark. *Loss of heterozygosity on chromosome 17q in epithelial ovarian tumors: association with carcinomas with serous differentiation*. Int J Gynecol Pathol, 2000. **19**(2): p. 152-7.
72. Wilson, C.A., ve ark. *Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 236-40.
73. Esteller, M., ve ark. *Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(7): p. 564-9.
74. Wang, C., ve ark. *Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene*. J Pathol, 2004. **202**(2): p. 215-23.
75. Ford, D., ve ark. *Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers*. Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet, 1994. **343**(8899): p. 692-5.
76. Breast Cancer Linkage, C., *Cancer risks in BRCA2 mutation carriers*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(15): p. 1310-6.
77. Boyd, J., *Specific keynote: hereditary ovarian cancer: what we know*. Gynecol Oncol, 2003. **88**(1 Pt 2): p. S8-10; discussion S11-3.
78. Lakhani, S.R., ve ark. *Pathology of ovarian cancers in BRCA1 and BRCA2 carriers*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(7): p. 2473-81.

79. Struewing J.P., ve ark. *The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews*. N Engl J Med, 1997. **336**(20): p. 1401-8.
80. Moslehi, R., ve ark. *BRCA1 ve BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(4): p. 1259-72.
81. Werness, B.A. ve G.H. Eltabbakh, *Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features*. Int J Gynecol Pathol, 2001. **20**(1): p. 48-63.
82. Phelan, C.M., ve ark. *Ovarian cancer risk in BRCA1 carriers is modified by the HRAS1 variable number of tandem repeat (VNTR) locus*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 309-11.
83. Levine, D.A. ve J. Boyd, *The androgen receptor and genetic susceptibility to ovarian cancer: results from a case series*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 908-11.
84. Narod, S.A., ve ark. *Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer*. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group. N Engl J Med, 1998. **339**(7): p. 424-8.
85. Whittemore, A.S., ve ark. *Oral contraceptive use and ovarian cancer risk among carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. Br J Cancer, 2004. **91**(11): p. 1911-5.
86. Piver, M.S., ve ark. *Familial ovarian cancer. A report of 658 families from the Gilda Radner Familial Ovarian Cancer Registry 1981-1991*. Cancer, 1993. **71**(2 Suppl): p. 582-8.
87. *NIH consensus conference. Ovarian cancer. Screening, treatment, and follow-up. NIH Consensus Development Panel on Ovarian Cancer*. JAMA, 1995. **273**(6): p. 491-7.
88. Kauff, N.D., ve ark. *Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. N Engl J Med, 2002. **346**(21): p. 1609-15.
89. Rebbeck, T.R., ve ark. *Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. N Engl J Med, 2002. **346**(21): p. 1616-22.
90. Bandera, C.A., ve ark. *BRCA1 gene mutations in women with papillary serous carcinoma of the peritoneum*. Obstet Gynecol, 1998. **92**(4 Pt 1): p. 596-600.
91. Levine, D.A., ve ark. *Fallopian tube and primary peritoneal carcinomas associated with BRCA mutations*. J Clin Oncol, 2003. **21**(22): p. 4222-7.
92. Casarsa, S., ve ark. *BRCA2 germline mutations in primary cancer of the fallopian tube*. Oncol Rep, 2004. **12**(2): p. 313-6.
93. Paley, P.J., ve ark. *Occult cancer of the fallopian tube in BRCA-1 germline mutation carriers at prophylactic oophorectomy: a case for recommending hysterectomy at surgical prophylaxis*. Gynecol Oncol, 2001. **80**(2): p. 176-80.
94. Garber, J.E. ve A.R. Hartman, *Prophylactic oophorectomy and hormone replacement therapy: protection at what price?* J Clin Oncol, 2004. **22**(6): p. 978-80.
95. Wooster, R. ve B.L. Weber, *Breast and ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. **348**(23): p. 2339-47.
96. Czyz, W., ve ark. *Genetic, environmental and stochastic factors in monozygotic twin discordance with a focus on epigenetic differences*. BMC Med, 2012. **10**: p. 93.
97. 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.

98. James, W.H., *Sex ratio in twin births*. Ann Hum Biol, 1975. **2**(4): p. 365-78.
99. Hall, J.G., *Twinning*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 735-43.
100. Martin, N., D. Boomsma, ve G. Machin, *A twin-pronged attack on complex traits*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 387-92.
101. Zwijnenburg, P.J., H. Meijers-Heijboer, ve D.I. Boomsma, *Identical but not the same: the value of discordant monozygotic twins in genetic research*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010. **153B**(6): p. 1134-49.
102. Amberger, J., ve ark. *McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D793-6.
103. Hong, D., ve ark. *Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia*. Science, 2008. **319**(5861): p. 336-9.
104. Boccon-Gibod, L., ve ark. *Separate occurrence of extra-adrenal paraganglioma and gastrointestinal stromal tumor in monozygotic twins: probable familial Carney syndrome*. Pediatr Dev Pathol, 2004. **7**(4): p. 380-4.
105. Pasini, B., ve ark. *Clinical and molecular genetics of patients with the Carney-Stratakis syndrome and germline mutations of the genes coding for the succinate dehydrogenase subunits SDHB, SDHC, and SDHD*. Eur J Hum Genet, 2008. **16**(1): p. 79-88.
106. Davin, J.C., ve ark. *Complement factor H-associated atypical hemolytic uremic syndrome in monozygotic twins: concordant presentation, discordant response to treatment*. Am J Kidney Dis, 2006. **47**(2): p. e27-30.
107. Verougstraete, C.M., J.A. Libert, ve H.R. Dorchy, *Discordant diabetic retinopathy in homozygous twins: the importance of good metabolic control*. J Pediatr, 1999. **134**(5): p. 658.
108. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, ve V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
109. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
110. Lai, E.C., ve ark. *Computational identification of Drosophila microRNA genes*. Genome Biol, 2003. **4**(7): p. R42.
111. Lim, L.P., ve ark. *The microRNAs of Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 2003. **17**(8): p. 991-1008.
112. Baskerville, S. ve D.P. Bartel, *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes*. RNA, 2005. **11**(3): p. 241-7.
113. Reinhart, B.J., ve ark. *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
114. Reinhart, B.J., ve ark. *MicroRNAs in plants*. Genes Dev, 2002. **16**(13): p. 1616-26.
115. Liu, J., *Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(2): p. 214-21.
116. Tsuchiya, S., Y. Okuno, ve G. Tsujimoto, *MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(4): p. 267-70.
117. Scaria, V., ve ark. *Host-virus interaction: a new role for microRNAs*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 68.

118. Tzur, G., ve ark. *Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development*. PLoS One, 2009. **4**(10): p. e7511.
119. Sevignani, C., ve ark. *MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 8017-22.
120. Calin, G.A. ve C.M. Croce, *Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2059-66.
121. Kim, V.N. ve J.W. Nam, *Genomics of microRNA*. Trends Genet, 2006. **22**(3): p. 165-73.
122. Sevignani, C., ve ark. *Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression*. Mamm Genome, 2006. **17**(3): p. 189-202.
123. Kim, Y.K. ve V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
124. Zhao, T., ve ark. *A complex system of small RNAs in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Genes Dev, 2007. **21**(10): p. 1190-203.
125. Rathjen, T., ve ark. *High throughput sequencing of microRNAs in chicken somites*. FEBS Lett, 2009. **583**(9): p. 1422-6.
126. Johansen, S.D., ve ark. *Large-scale sequence analyses of Atlantic cod*. N Biotechnol, 2009. **25**(5): p. 263-71.
127. Kato, M., ve ark. *Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during Caenorhabditis elegans development*. Genome Biol, 2009. **10**(5): p. R54.
128. Han, J., ve ark. *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex*. Cell, 2006. **125**(5): p. 887-901.
129. Macias, S., R.A. Cordiner, ve J.F. Caceres, *Cellular functions of the microprocessor*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(4): p. 838-43.
130. Mueller, G.A., ve ark. *Solution structure of the Drosha double-stranded RNA-binding domain*. Silence, 2010. **1**(1): p. 2.
131. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, ve N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
132. Di Leva, G., G.A. Calin, ve C.M. Croce, *MicroRNAs: fundamental facts and involvement in human diseases*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2006. **78**(2): p. 180-9.
133. Redfern, A.D., ve ark. *RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(16): p. 6536-41.
134. Valencia-Sanchez, M.A., ve ark. *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
135. Iwakawa, H.O. ve Y. Tomari, *The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 651-65.
136. Pillai, R.S., *MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?* RNA, 2005. **11**(12): p. 1753-61.
137. Curtale, G. ve F. Citarella, *Dynamic nature of noncoding RNA regulation of adaptive immune response*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 17347-77.

138. Calin, G.A., ve ark. *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
139. Calin, G.A. ve C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 857-66.
140. Esquela-Kerscher, A. ve F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
141. Zhang B., ve ark. *microRNAs as oncogenes and tumor suppressors*. Dev Biol, 2007. **302**(1): p. 1-12.
142. Shenouda, S.K. ve S.K. Alahari, *MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor?* Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(3-4): p. 369-78.
143. Frixa, T., S. Donzelli, ve G. Blandino, *Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation*. Cancers (Basel), 2015. **7**(4): p. 2466-85.
144. Gulyaeva, L.F. ve N.E. Kushlinskiy, *Regulatory mechanisms of microRNA expression*. J Transl Med, 2016. **14**(1): p. 143.
145. Fabbri, M., ve ark. *Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(7): p. 1009-19.
146. Cowland, J.B., C. Hother, ve K. Gronbaek, *MicroRNAs and cancer*. APMIS, 2007. **115**(10): p. 1090-106.
147. Zhang L., ve ark. *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9136-41.
148. Georges, M., W. Coppieters, ve C. Charlier, *Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease*. Curr Opin Genet Dev, 2007. **17**(3): p. 166-76.
149. Wu, M., ve ark. *Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs*. Carcinogenesis, 2008. **29**(9): p. 1710-6.
150. Shen, X., ve ark. *Identification of a novel microRNA, miR-4449, as a potential blood based marker in multiple myeloma*. Clin Chem Lab Med, 2017. **55**(5): p. 748-754.
151. Zhong, X., ve ark. *MiR-4653-3p and its target gene FRS2 are prognostic biomarkers for hormone receptor positive breast cancer patients receiving tamoxifen as adjuvant endocrine therapy*. Oncotarget, 2016. **7**(38): p. 61166-61182.
152. Ma, H., ve ark. *Estrogen receptor-mediated miR-486-5p regulation of OLFM4 expression in ovarian cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(9): p. 10594-605.
153. Mees, S.T., ve ark. *Involvement of CD40 targeting miR-224 and miR-486 on the progression of pancreatic ductal adenocarcinomas*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(8): p. 2339-50.
154. Yoo, J.K., ve ark. *The hsa-miR-5739 modulates the endoglin network in endothelial cells derived from human embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(2): p. 258-62.
155. Latchana, N., ve ark. *Global microRNA profiling for diagnostic appraisal of melanocytic Spitz tumors*. J Surg Res, 2016. **205**(2): p. 350-358.
156. Liu, D.R., ve ark. *miR-1260b is a Potential Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer*. Med Sci Monit, 2016. **22**: p. 2417-23.
157. Xu, L., ve ark. *Overexpression of miR-1260b in Non-small Cell Lung Cancer is Associated with Lymph Node Metastasis*. Aging Dis, 2015. **6**(6): p. 478-85.
158. Hirata, H., ve ark. *Genistein downregulates onco-miR-1260b and inhibits Wnt-signalling in renal cancer cells*. Br J Cancer, 2013. **108**(10): p. 2070-8.

159. Wu, Q., ve ark. *miR-17-5p promotes proliferation by targeting SOCS6 in gastric cancer cells*. FEBS Lett, 2014. **588**(12): p. 2055-62.
160. Li, L., ve ark. *MiR-17-5p up-regulates YES1 to modulate the cell cycle progression and apoptosis in ovarian cancer cell lines*. J Cell Biochem, 2015. **116**(6): p. 1050-9.
161. Fang, Y., C. Xu, ve Y. Fu, *MicroRNA-17-5p induces drug resistance and invasion of ovarian carcinoma cells by targeting PTEN signaling*. J Biol Res (Thessalon), 2015. **22**: p. 12.
162. Tian, F., ve ark. *Aberrant miR-181b-5p and miR-486-5p expression in serum and tissue of non-small cell lung cancer*. Gene, 2016. **591**(2): p. 338-43.
163. Zhi, F., ve ark. *Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56718.
164. Wang, Y., ve ark. *Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p*. Tumour Biol, 2016. **37**(8): p. 10965-79.
165. Sand, M., ve ark. *Comparative microarray analysis of microRNA expression profiles in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases, and benign melanocytic nevi*. Cell Tissue Res, 2013. **351**(1): p. 85-98.
166. Hamam, R., ve ark. *microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 25997.
167. Komina, A., ve ark. *Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of MiR-4286 Inhibition in Melanoma Cells*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168229.
168. Huang, H., ve ark. *miR-5100 promotes tumor growth in lung cancer by targeting Rab6*. Cancer Lett, 2015. **362**(1): p. 15-24.
169. Bignotti, E., ve ark. *Identification of stably expressed reference small non-coding RNAs for microRNA quantification in high-grade serous ovarian carcinoma tissues*. J Cell Mol Med, 2016. **20**(12): p. 2341-2348.
170. Xu, H., ve ark. *Let-7b-5p regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting IGF1R*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(11): p. 965-72.
171. Petrillo, M., ve ark. *Identification of high-grade serous ovarian cancer miRNA species associated with survival and drug response in patients receiving neoadjuvant chemotherapy: a retrospective longitudinal analysis using matched tumor biopsies*. Ann Oncol, 2016. **27**(4): p. 625-34.
172. Parikh, A., ve ark. *microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 2977.
173. Mi, Y., ve ark. *miR-181a-5p promotes the progression of gastric cancer via RASSF6-mediated MAPK signalling activation*. Cancer Lett, 2017. **389**: p. 11-22.
174. Wang, Y.Y., ve ark. *LINC00312 inhibits the migration and invasion of bladder cancer cells by targeting miR-197-3p*. Tumour Biol, 2016. **37**(11): p. 14553-14563.
175. Liu, K., ve ark. *Overexpression of long intergenic noncoding RNA LINC00312 inhibits the invasion and migration of thyroid cancer cells by down-regulating microRNA-197-3p*. Biosci Rep, 2017. **37**(4).

176. Baez-Vega, P.M., ve ark. *Targeting miR-21-3p inhibits proliferation and invasion of ovarian cancer cells*. Oncotarget, 2016. **7**(24): p. 36321-36337.
177. Kao, H.W., ve ark. *Urine miR-21-5p as a potential non-invasive biomarker for gastric cancer*. Oncotarget, 2017.
178. Fang, G., ve ark. *MicroRNA-223-3p Regulates Ovarian Cancer Cell Proliferation and Invasion by Targeting SOX11 Expression*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(6).
179. Wen, Y.C., ve ark. *By inhibiting snail signaling and miR-23a-3p, osthole suppresses the EMT-mediated metastatic ability in prostate cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(25): p. 21120-36.
180. Liang, J., ve ark. *miR-27a-3p targeting RXRalpha promotes colorectal cancer progression by activating Wnt/beta-catenin pathway*. Oncotarget, 2017.
181. Zhou, L., ve ark. *MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2*. Oncotarget, 2016. **7**(32): p. 51943-51954.
182. Gao, D., ve ark. *miRNA Expression Profiles of HPV-Infected Patients with Cervical Cancer in the Uyghur Population in China*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164701.
183. Lin, K., ve ark. *MicroRNA expression profiles predict progression and clinical outcome in lung adenocarcinoma*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 5679-5692.
184. Zhang Z., ve ark. *Clinical value of miR-425-5p detection and its association with cell proliferation and apoptosis of gastric cancer*. Pathol Res Pract, 2017. **213**(8): p. 929-937.
185. Sun, L., ve ark. *MicoRNA-425-5p is a potential prognostic biomarker for cervical cancer*. Ann Clin Biochem, 2017. **54**(1): p. 127-133.
186. Wu, A.H., ve ark. *MiR-572 prompted cell proliferation of human ovarian cancer cells by suppressing PPP2R2C expression*. Biomed Pharmacother, 2016. **77**: p. 92-7.
187. Zhang X., ve ark. *Upregulation of miR-572 transcriptionally suppresses SOCS1 and p21 and contributes to human ovarian cancer progression*. Oncotarget, 2015. **6**(17): p. 15180-93.
188. Ma, D.L., ve ark. *Influence of continuous intervention on growth and metastasis of human cervical cancer cells and expression of RNA miR-574-5p*. J Biol Regul Homeost Agents, 2016. **30**(1): p. 91-102.
189. Ji, S., ve ark. *miR-574-5p negatively regulates Qki6/7 to impact beta-catenin/Wnt signalling and the development of colorectal cancer*. Gut, 2013. **62**(5): p. 716-26.
190. Yoo, J.K., ve ark. *miR-7641 modulates the expression of CXCL1 during endothelial differentiation derived from human embryonic stem cells*. Arch Pharm Res, 2013. **36**(3): p. 353-8.
191. Niu, X., ve ark. *miR-1273g-3p modulates activation and apoptosis of hepatic stellate cells by directly targeting PTEN in HCV-related liver fibrosis*. FEBS Lett, 2016. **590**(16): p. 2709-24.
192. Jin, S., ve ark. *A Novel Role for miR-1305 in Regulation of Pluripotency-Differentiation Balance, Cell Cycle, and Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells*. Stem Cells, 2016. **34**(9): p. 2306-17.
193. Ries, J., ve ark. *miR-186, miR-3651 and miR-494: potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma extracted from whole blood*. Oncol Rep, 2014. **31**(3): p. 1429-36.

194. Wang, C., ve ark. *Clinical potential of miR-3651 as a novel prognostic biomarker for esophageal squamous cell cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **465**(1): p. 30-4.
195. Fiala, O., ve ark. *The association of miR-126-3p, miR-126-5p and miR-664-3p expression profiles with outcomes of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab*. Tumour Biol, 2017. **39**(7): p. 1010428317709283.
196. Xiong, Y., ve ark. *miR-126-3p Inhibits Thyroid Cancer Cell Growth and Metastasis, and Is Associated with Aggressive Thyroid Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0130496.
197. Guo, C., ve ark. *The noncoding RNA, miR-126, suppresses the growth of neoplastic cells by targeting phosphatidylinositol 3-kinase signaling and is frequently lost in colon cancers*. Genes Chromosomes Cancer, 2008. **47**(11): p. 939-46.
198. Meister, J. ve M.H. Schmidt, *miR-126 and miR-126*: new players in cancer*. ScientificWorldJournal, 2010. **10**: p. 2090-100.
199. Wang, J., ve ark. *MicroRNA-320a is downregulated in non-small cell lung cancer and suppresses tumor cell growth and invasion by directly targeting insulin-like growth factor 1 receptor*. Oncol Lett, 2017. **13**(5): p. 3247-3252.
200. Xishan, Z., ve ark. *MicroRNA-320a acts as a tumor suppressor by targeting BCR/ABL oncogene in chronic myeloid leukemia*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 12460.
201. Tadano, T., ve ark. *MicroRNA-320 family is downregulated in colorectal adenoma and affects tumor proliferation by targeting CDK6*. World J Gastrointest Oncol, 2016. **8**(7): p. 532-42.
202. Vishnubalaji, R., ve ark. *MicroRNA-320 suppresses colorectal cancer by targeting SOX4, FOXM1, and FOXQ1*. Oncotarget, 2016. **7**(24): p. 35789-35802.
203. Gu, G., ve ark. *Overexpression of ARF1 is associated with cell proliferation and migration through PI3K signal pathway in ovarian cancer*. Oncol Rep, 2017. **37**(3): p. 1511-1520.
204. Kratz, A.S., ve ark. *Fbxo28 promotes mitotic progression and regulates topoisomerase IIalpha-dependent DNA decatenation*. Cell Cycle, 2016. **15**(24): p. 3419-3431.
205. *The RNA-Binding Protein SYNCRIP Promotes Leukemogenesis*. Cancer Discov, 2017. **7**(6): p. OF16.
206. Liu, C., ve ark. *miR-324-3p suppresses migration and invasion by targeting WNT2B in nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Cell Int, 2017. **17**: p. 2.
207. Kuo, W.T., ve ark. *MicroRNA-324 in Human Cancer: miR-324-5p and miR-324-3p Have Distinct Biological Functions in Human Cancer*. Anticancer Res, 2016. **36**(10): p. 5189-5196.
208. Matamala, N., ve ark. *Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection*. Clin Chem, 2015. **61**(8): p. 1098-106.
209. Yang F., ve ark. *A novel berbamine derivative inhibits cell viability and induces apoptosis in cancer stem-like cells of human glioblastoma, via up-regulation of miRNA-4284 and JNK/AP-1 signaling*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94443.
210. Kim, Y.J., ve ark. *HNRNPAl, a Splicing Regulator, Is an Effective Target Protein for Cervical Cancer Detection: Comparison With Conventional Tumor Markers*. Int J Gynecol Cancer, 2017. **27**(2): p. 326-331.

211. Chowdhari, S. ve N. Saini, *hsa-miR-4516 mediated downregulation of STAT3/CDK6/UBE2N plays a role in PUVA induced apoptosis in keratinocytes*. J Cell Physiol, 2014. **229**(11): p. 1630-8.
212. Liu, J., ve ark. *miR-1285-3p acts as a potential tumor suppressor miRNA via downregulating JUN expression in hepatocellular carcinoma*. Tumour Biol, 2015. **36**(1): p. 219-25.
213. Hu, Y., ve ark. *miR-484 suppresses proliferation and epithelial-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SMAD2 in cervical cancer cells*. Cancer Cell Int, 2017. **17**: p. 36.
214. Lu, X. ve J. Lu, *The significance of detection of serum miR-423-5p and miR-484 for diagnosis of colorectal cancer*. Clin Lab, 2015. **61**(1-2): p. 187-90.
215. Guo, Y., ve ark. *miR-564 is downregulated in gastric carcinoma and targets E2F3*. Oncol Lett, 2017. **13**(6): p. 4155-4160.
216. Mutlu, M., ve ark. *miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 32541.
217. Yang B., ve ark. *MiR-564 functions as a tumor suppressor in human lung cancer by targeting ZIC3*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **467**(4): p. 690-6.
218. Zheng H., ve ark. *MicroRNA-1225-5p inhibits proliferation and metastasis of gastric carcinoma through repressing insulin receptor substrate-1 and activation of beta-catenin signaling*. Oncotarget, 2016. **7**(4): p. 4647-63.
219. Li, M., ve ark. *Expression of microRNA-142-3p in cervical cancer and its correlation with prognosis*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. **21**(10): p. 2346-2350.
220. Wu, L., ve ark. *MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells*. FEBS Lett, 2011. **585**(9): p. 1322-30.
221. Guo, K., ve ark. *Loss of miR-26a-5p promotes proliferation, migration, and invasion in prostate cancer through negatively regulating SERBP1*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 12843-12854.
222. Miyamoto, K., ve ark. *Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer*. Br J Cancer, 2016. **115**(3): p. 354-63.
223. Zhang Y., ve ark. *Serum miRNAs panel (miR-16-2*, miR-195, miR-2861, miR-497) as novel non-invasive biomarkers for detection of cervical cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17942.
224. Xu, J., ve ark. *miR-2861 acts as a tumor suppressor via targeting EGFR/AKT2/CCND1 pathway in cervical cancer induced by human papillomavirus virus 16 E6*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28968.
225. Gao, Y., ve ark. *Down-regulation of miR-342-3p in hepatocellular carcinoma tissues and its prognostic significance*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017. **21**(9): p. 2098-2102.
226. Li, X.R., ve ark. *miR-342-3p suppresses proliferation, migration and invasion by targeting FOXM1 in human cervical cancer*. FEBS Lett, 2014. **588**(17): p. 3298-307.
227. Xie, X., ve ark. *miR-342-3p targets RAP2B to suppress proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells*. Tumour Biol, 2015. **36**(7): p. 5031-8.

228. Zhang T., ve ark. *MicroRNA-4530 promotes angiogenesis by targeting VASH1 in breast carcinoma cells*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(1): p. 111-118.
229. Liu, Y., ve ark. *[Detection and correlation analysis of miRNAs and myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer-bearing mice]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2015. **31**(4): p. 467-9, 473.
230. Yan, S., ve ark. *Exosome-encapsulated microRNAs as circulating biomarkers for colorectal cancer*. *Oncotarget*, 2017.
231. Zhang Y., ve ark. *Loss of miR-638 promotes invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting SOX2 in hepatocellular carcinoma*. *Oncol Rep*, 2017. **37**(1): p. 323-332.
232. Zhang J., ve ark. *MicroRNA-638 inhibits cell proliferation, invasion and regulates cell cycle by targeting tetraspanin 1 in human colorectal carcinoma*. *Oncotarget*, 2014. **5**(23): p. 12083-96.
233. Tan, X., ve ark. *miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2014. **16**(5): p. 435.
234. Langhe, R., ve ark. *A novel serum microRNA panel to discriminate benign from malignant ovarian disease*. *Cancer Lett*, 2015. **356**(2 Pt B): p. 628-36.
235. Qin, X., ve ark. *MicroRNA-125a-5p modulates human cervical carcinoma proliferation and migration by targeting ABL2*. *Drug Des Devel Ther*, 2016. **10**: p. 71-9.
236. Zhong, L., ve ark. *MicroRNA-125a-5p plays a role as a tumor suppressor in lung carcinoma cells by directly targeting STAT3*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(6): p. 1010428317697579.
237. Xia, B., ve ark. *Long non-coding RNA ZFAS1 interacts with miR-150-5p to regulate Sp1 expression and ovarian cancer cell malignancy*. *Oncotarget*, 2017. **8**(12): p. 19534-19546.
238. Li, T., ve ark. *miR-150-5p inhibits hepatoma cell migration and invasion by targeting MMP14*. *PLoS One*, 2014. **9**(12): p. e115577.
239. Chen, J., ve ark. *Berberine upregulates miR-22-3p to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Sp1*. *Am J Transl Res*, 2016. **8**(11): p. 4932-4941.
240. Chen, Q., ve ark. *miR-126-3p and miR-451a correlate with clinicopathological features of lung adenocarcinoma: The underlying molecular mechanisms*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(2): p. 909-17.
241. Minna, E., ve ark. *miR-451a is underexpressed and targets AKT/mTOR pathway in papillary thyroid carcinoma*. *Oncotarget*, 2016. **7**(11): p. 12731-47.
242. Song, W., ve ark. *PARP inhibitor increases chemosensitivity by upregulating miR-664b-5p in BRCA1-mutated triple-negative breast cancer*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 42319.

ETİK KURUL KARARI



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



Sayı : 17

Konu : Prof. Dr. Hülya YAZICI

Tarih : 11.01.2016

Sayın Prof. Dr. Hülya YAZICI

Onkoloji Enstitüsü

İlgi : Onkoloji Enstitüsünün 30/12/2015 gün ve 414805 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Araş. Gör. Şeref Buğra TUNÇER' in yürüteceği 2016/4 dosya numaralı "Over Kanseri Aile Bireylerinde tüm genom miRNA moleküllerinin Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 08/01/2016 tarih ve 01 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar

Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itifetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Over Kanserli Aile Bireylerinde tüm genom miRNA moleküllerinin Araştırılması"			
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Hülya YAZICI			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Kanser Genetiği			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü			
DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi			
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer ise belirtiniz :			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Over Kanserli Aile Bireylerinde tüm genom miRNA moleküllerinin Araştırılması"
-----------------------	--

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	04.01.2016		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
	DİĞER:	☒ Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01	Tarih: 08/01/2016		
İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsünde görevli Prof. Dr. Hülya YAZICI'nın sorumluluğunda ve Araş. Gör. Şeref Buğra ULUNÇER'in başkanlığında yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU									
ÇALIŞMA ESASI			19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:			Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.U. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile ilişki
 ** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

İNTİHAL RAPOR FORMU

OVER KANSERLİ AİLE BİREYLERİNDE TÜM GENOM miRNA MOLEKÜLLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YAZAR SERİF BUĞRA TUNÇER

ORJİNALLIK RAPORU

%5

BENZERLİK İNDEKSİ

%3

İNTERNET
KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%3

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Pamukkale Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

%1

2

Zhan, Cheng, Li Yan, Lin Wang, Wei Jiang, Yongxing Zhang, Junjie Xi, Li Chen, Yulin Jin, Yulei Qiao, Yu Shi, and Qun Wang.
"Identification of reference miRNAs in human tumors by TCGA miRNA-seq data",
Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014.

Yayın

%1

3

www.sabiosciences.com

İnternet Kaynağı

%1

4

Submitted to University of Dundee

Öğrenci Ödevi

<%1

5

Haakensen, Vilde D., Vegard Nygaard, Liliana Greger, Miriam R. Aure, Bastian Fromm, Ida R. K. Bukholm, Torben Lüders, Suet-Feung Chin, Anna Git, Carlos Caldas, Vessela N. Kristensen,

<%1