



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

ENDOMETRİAL KANSERDE PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAĞINI ETKİLEYEN MİRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

HASAN ÖZ

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS-2023

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

ENDOMETRİAL KANSERDE PI3K/AKT/mTOR SİNYAL YOLAĞINI ETKİLEYEN MİRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

HASAN ÖZ

ORCID ID: 0000-0002-0177-2155

DANIŞMAN
PROF.DR. NECMİYE CANACANKATAN

İKİNCİ DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞERİFE EFSUN ANTMEN

ECZACILIK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS-2023

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

10 /08/ 2023

İmza / Signature



Hasan ÖZ

ÖZET

Endometrial Kanserde PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağını etkileyen miRNA'ların Araştırılması

Endometrial kanser dünya genelinde kadınlar arasında oldukça yaygınlık gösteren bir kanser tipidir. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliği birçok kanser tipinin patogeneğinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada PI3K/AKT/mTOR yolağını etkileyen miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p ve miR-222-3p' nin endometrial kanserde in siliko analizleri ve ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Bu çalışmaya endometrioid adenokarsinom tanısı almış Grade 1 (n=16), Grade 2 (n=16) ve Grade 3 (n=16) arşiv dokuları ile endometrial kanser tanısı almamış Kontrol 1 (n=16) sekretuar faz ve Kontrol 2 (n=16) proliferatif faz sağlıklı endometrium arşiv dokuları dahil edilmiştir.

İn siliko analizlerle miRNA'lar ile hedef genleri arasındaki moleküler etkileşimler incelendi. İn siliko analizlerle miR-7-5p'nin hedefleri PIK3CD, PIK3R3, PIK3CB ve AKT3, miR-17-5p'nin hedefleri PIK3R1 ve AKT3, miR-21-5p'nin hedefi PIK3R1, miR-125b-5p'nin hedefi PIK3C2B, miR-145-5p'nin hedefi AKT3, miR-155-5p'nin hedefleri PIK3CA ve PIK3R1, miR-206'nın hedefi PIK3C2A, miR-221-3p ve miR-222-3p'nin hedefi PIK3R1 ve miR-223-3p'nin hedefi PIK3C2A olarak belirlendi.

miRNA ekspresyon analizleri RT-PCR yöntemi kullanılarak yapıldı. miR-7-5p ve miR-206'nın ekspresyonları Kontrol 1 ve Kontrol 2'ye göre Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 'de ($p<0,05$). miR-145-5p ekspresyonu Grade-1'de Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre Grade-2 ve Grade-3'te Kontrol-2'ye ($p<0,05$) göre azaldığı gözlemlendi. miR-17-5p ve miR-222-3p'nin ekspresyonlarının Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre Grade 1, Grade 2 ve Grade 3 'de arttığı saptandı ($p<0,05$). miR-221-3p ekspresyonunun Grade-1 ve Grade-3'te Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre, Grade-2'de ise Kontrol-1'e göre arttığı tespit edildi ($p<0,05$). miR-21-5p ve miR-155-5p ekspresyon düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi. Sonuç olarak; Endometrial Kanserde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağında etkinliği tespit edilen miRNA'lar moleküler hedefe yönelik tedavi ve tanı stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Biyobelirteç, Endometrial Kanseri, İn siliko analiz, MikroRNA, PI3K/AKT/mTOR.

ABSTRACT

Investigation of miRNAs that affect PI3K / AKT / mTOR Signaling Pathway in Endometrial Cancer

Endometrial cancer is a very common type of cancer among women worldwide. Irregularity of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway plays a role in the pathogenesis of many cancer types. In this study, In silico analysis and expression levels of miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p and miR 222-3p, which affect the PI3K/AKT/mTOR pathway, were evaluated in endometrial cancer. In this study, Grade-1 (n=16), Grade-2 (n=16) and Grade-3 (n=16), archival tissues diagnosed with endometrioid adenocarcinoma, Control-1 (n=16) secretory phase and Control-2 (n=16) proliferative phase healthy endometrial archival tissues without endometrial cancer were included.

In silico analyses examined molecular interactions between miRNAs and target genes. In silico analysis identified that miR-7-5p targets PIK3CD, PIK3R3, PIK3CB and AKT3, miR-17-5p targets PIK3R1 and AKT3, miR-21-5p targets PIK3R1, miR-125b-5p targets PIK3C2B, miR-145-5p targets AKT3, miR-155-5p targets PIK3CA and PIK3R1, miR-206 targets PIK3C2A, miR-221-3p and miR-222-3p target PIK3R1, miR-223-3p targets PIK3C2A.

miRNA expression analysis was performed by the RT-PCR method. The expressions of miR-7-5p and miR-206 were higher in Grade-1, Grade-2, and Grade-3 than in Control-1 and Control-2 ($p<0.05$). It was observed that miR-145-5p expression decreased in Grade-1 compared to Control-1 and Control-2, and decreased in Grade-2 and Grade-3 compared to Control-2 ($p<0.05$).

It was determined that the expressions of miR-17-5p and miR-222-3p increased in Grade-1, Grade-2 and Grade-3 compared to Control-1 and Control-2 ($p<0.05$). It was determined that miR-221-3p expression increased in Grade-1 and Grade-3 compared to Control-1 and Control-2, and in Grade-2 compared to Control-1 ($p<0.05$). No statistically significant difference was observed between the groups in the expression levels of miR-21-5p and miR-155-5p. In conclusion; miRNAs detected to be active in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in Endometrial Cancer will contribute to the development of molecular targeted treatment and diagnostic strateg.

Keywords: Biomarker, Endometrial Cancer, in silico analysis, MicroRNA, PI3K/AKT/mTOR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesinde ve tamamlanmasında büyük emeği geçen, her zaman desteği ve yardımlarıyla yol göstericimiz olan, değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Necmiye CANACANKANTAN'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın tamamlanmasında emeği geçen, yol gösteren ve katkılar sağlayan ikinci tez danışmanım Dr.Öğr. Üyesi Şerife Efsun ANTMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamın deneysel aşamasında büyük yardımları olan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hakan AYTAN ve Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Ferah TUNCEL'e teşekkür ederim.

Çalışmama 2021-1-TP3-4160 nolu proje ile verdiği destekten dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitim dönemi boyunca deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Son olarak; bugünlere gelmemi sağlayan, büyük emekler sarf eden ve her zaman destekçim olan annem Fatma ÖZ, babam Fevzi ÖZ ve kardeşim Melek ÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2021-1-TP3-4160

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve ŞİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Endometrial Kanser	3
2.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	3
2.1.2. Endometrial Kanserde Sınıflandırma ve Derecelendirme	7
2.1.3. Endometrial Kanserde Genetik Değişikler	10
2.1.3.1. Tip 1 Endometrial Kanselerde Genetik Değişikler	11
2.1.3.2. Tip 2 Endometrial Kanselerde Genetik Değişikler	12
2.1.4. Endometrial Kanserde Biyobelirteçler	13
2.2. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu	14
2.2.1. Fosfotidilinositol 3-Kinaz	15
2.2.2. Protein Kinaz B	16
2.2.3. Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi	16
2.2.4. Hücre Sağ Kalımı ve Kemoterapötik Dirençte PI3K/AKT/mTOR Yolu	17
2.2.5. Hücre Proliferasyonunda PI3K/AKT/mTOR Yolu	17
2.2.6. Kanser Metastazında PI3K/AKT/mTOR Yolu	18
2.2.7. Kanser Anjiyogenezinde PI3K/AKT/mTOR Yolu	18
2.3. Mikro RNA	18
2.3.1. miRNA Biyogenezi	19
2.3.2. Kanserde miRNA'lar	21
2.3.3. Kanserde Biyobelirteç Olarak miRNA'lar	23
2.3.4. Kanser Tedavisinde miRNA'lar	26
2.3.5. PI3K/AKT/mTOR Yolağına Etki Eden miRNA'lar	28
2.3.6. Endometrial Kanser ve miRNA'lar	34
	vii

	Sayfa
3. MATERYAL ve YÖNTEM	38
3.1. Materyal	38
3.2. Yöntem	38
3.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	38
3.2.2. Çalışma Örneklerinin Elde Edilmesi	39
3.2.3. İn Siliko Analizler	39
3.2.3.1. miRNA'ların ve Hedeflerinin Belirlenmesi	40
3.2.3.2. miRNA'ların Birincil, İkincil ve Üçüncül Yapılarının Belirlenmesi	40
3.2.3.3. Argonout Proteinin Yapı Hazırlığı	40
3.2.3.4. Moleküler Yerleştirme	40
3.2.4. miRNA'ların Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi	40
3.2.4.1. Deparafinizasyonu ve miRNA İzolasyonu	41
3.2.4.2. Komplementer DNA Eldesi	41
3.2.4.3. Real Time PCR Analizi ile miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	42
3.2.5. İstatiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Çalışma Gruplarını Tanımlayıcı Bilgiler	44
4.2. İn Siliko Analizler	44
4.2.1. Çalışılacak miRNA'ların Hedefleri	44
4.2.2. miRNA-Hedef Gen mRNA Komplekslerinin Yapısal Modelinin Tahmini	46
4.2.3. Üç Boyutlu Yapı Modellemesi	50
4.2.4. AGO Proteinin Yapısı	53
4.2.5. Moleküler Yerleştirme	54
4.2.5.1. miRNA'lar ve AGO Proteini Arasındaki Moleküler Yerleştirme Analizi	54
4.2.5.2. AGO Proteini ve miRNA-mRNA Kompleksi Arasındaki Moleküler Yerleştirme Analizi	58
4.3. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	65
4.3.1. miR-7-5p Ekspresyon Düzeyi	65
4.3.2. miR-17-5p Ekspresyon Düzeyi	66
4.3.3. miR-21-5p Ekspresyon Düzeyi	67
4.3.4. miR-145-5p Ekspresyon Düzeyi	68
4.3.5. miR-155-5p Ekspresyon Düzeyi	69
4.3.6. miR-206 Ekspresyon Düzeyi	70
4.3.7. miR-221-3p Ekspresyon Düzeyi	70

	Sayfa
4.3.8. miR-222-3p Ekspresyon Düzeyi	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
5.1. Tartışma	73
5.2. Sonuç	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	104



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Endometrial kanser türleri ve özellikleri	4
Tablo 2.2. Tip I endometrial kanser risk faktörleri	4
Tablo 2.3. Endometrial kanser WHO 2003 histolojik sınıflandırması	7
Tablo 2.4. FIGO Evrelemesi	8
Tablo 2.5. TCGA genomik alt tiplerinin moleküler ve patolojik özellikleri	9
Tablo 2.6. Tip I ve Tip II endometrial kanserdeki genetik değişiklikler	10
Tablo 2.7. Kanser tanı, prognoz ve tedavi takibi için kullanılabilecek potansiyel miRNA biyobelirteç örnekleri	25
Tablo 2.8. Çeşitli Kanserlerde PI3K/AKT/mTOR yolağına etki eden çalışılacak miRNA'lar ve hedefleri	31
Tablo 2.9. Endometrial kanserde ifade edilen bazı miRNA'lar ve hedefleri	35
Tablo 3.1. cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları	41
Tablo 3.2. Real Time PCR analizi için bileşenler ve miktarları	42
Tablo 3.3. Primer Dizileri	42
Tablo 3.4. Real Time PCR çalışma protokolü	43
Tablo 4.1. Çalışma gruplarının dağılım oranları	44
Tablo 4.2. miRNA hedeflerinin bağlanma bölgeleri	45
Tablo 4.3. İkincil yapılar ve minimum serbest enerjileri (MFE)	46
Tablo 4.4. miRNA ve AGO proteini arasındaki yerleştirme puanları	54
Tablo 4.5. miRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları	57
Tablo 4.6. miRNA ve hedefleri ile AGO proteini arasındaki yerleştirme puanları	58
Tablo 4.7. miRNA-mRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1. miRNA ve hedeflerinin oluşturduğu yapıların üç boyutlu modellemesi	50
Şekil 4.2. Reseptör protein (3D AGO proteini)	53
Şekil 4.3. Düzenlenmiş reseptör (3D AGO proteini A zinciri)	53
Şekil 4.4. miRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteinin amino asit kalıntıları	55
Şekil 4.5. miRNA-mRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteinin amino asit kalıntıları	62
Şekil 4.6. miR-7-5p ekspresyon düzeyleri	66
Şekil 4.7. miR-17-5p ekspresyon düzeyleri	67
Şekil 4.8. miR-21-5p ekspresyon düzeyleri	68
Şekil 4.9. miR-145-5p ekspresyon düzeyleri	69
Şekil 4.10. miR-155-5p ekspresyon düzeyleri	69
Şekil 4.11. miR-206 ekspresyon düzeyleri	70
Şekil 4.12. miR-221-3p ekspresyon düzeyleri	71
Şekil 4.13. miR-222-3p ekspresyon düzeyleri	72

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
ACE	Atomik temas enerjisi
AGO2	Argonaute proteini
AKT	Protein Kinaz B
ARID 1A	AT- Rich Intraction Domain 1A
ASO	Antisens Oligonükleotid
BAD	Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü antagonisti
BAX	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
BİM	Proapoptotik protein
Bcl-2	B-cell lenfoma 2 geni
BMI	Vücut Kitle İndeksi
BMI-1	B lenfoma Mo-MLV yerleştirme bölgesi 1
BRCA	Meme kanseri yatkınlık geni
CA 15.3	Kanser antijen 15.3
CA 125	Kanser antijen 125
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz
CTNNB1	β -Katenin
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DLBCL	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
Dnmt	DNA metil transferaz
EMT	Epitelyal-mezenkimal geçiş
ErbB	Epidermal büyüme faktörü
ERRBB2	Erb-b2 reseptör tirozin kinaz 2
ESCC	Özofagus skuamöz hücreli karsinom
EZH2	Enhancer Zeste Homolog 2
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
FIGO	Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
FOXO	Forkhead box transkripsiyon faktörleri ailesi
GPCR	G proteini kenetli resptörler
GSK3	Glikojen sentaz kinaz 3
HCC	Hepatosellüler karsinom
HE-4	İnsan epididimal proteini E4
HER2/neu	Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
HIF-1 α	Hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 α
HNPCC	Kalıtsal nonpolip kolorektal kanser

Kısaltma/Simge	Tanım
IGF-1R	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 Reseptörü
ILK	İntegrin bağlantılı kinaz
IPA	İnvaziv hipofiz adenomu
KRAS	Kristen rat sarcoma virus
LOH	Heterozigote kaybı
Mcl-1	Miyoloid hücre lösemi-1
MDM-2	Mouse double mite 2 homolog
c-Met	Hepatosit büyüme faktörü
mLST8	Mamalian lethal with Sec13 protein 8
MFE	Minimum serbest enerji
MnSOD	Manganez süperoksit dismutaz
MSI	Mikrosatellit instabil
mSIN1	Memeli stres ile aktive olan protein kinaz etkileşimli protein 1
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
mTORC1	mTOR kompleks 1
mTORC2	mTOR kompleks 2
MYC	Transkripsiyon faktörlerini düzenleyici gen
NSCLC	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PDK2	3-Fosfoinozotid-bağımlı protein kinaz 2
PH	Plekstrin homoloji
PI3K	Fosfoditilinositol 3-kinaz
PIK3CA	PI3K'nın p110 α katalitik alt birimi
PIK3CD	Fosfoditilinositol 3-kinaz katalitik alt birim delta
PIK3C2A	Fosfoditilinositol 3-kinaz katalitik alt birim tip 2 alfa
PIK3C2B	Fosfoditilinositol 3-kinaz katalitik alt birim tip 2 beta
PIK3R1	PI3K'nın p85a düzenleyici alt birimi
PIK3R2	Fosfoditilinositol 3-kinaz düzenleyici alt birim β
PIK3R3	Fosfoditilinositol 3-kinaz düzenleyici alt birim 3
PI3P	Fosfatidilinositol 3 fosfat
PKOS	Polikistik over sendromu
PRAS40	Prolin açısından zengin AKT substratı
Protor-1	Protein observed with rictor-1
POLE	Polimeraz epsilon
PTEN	Fosfataz ve tensin homoloğu
Rbl2	Retinablastoma benzeri 2 protein

Kısaltma/Simgesi	Tanım
RISC	RNA ile indüklenabilir susturucu kompleks
RMSD	Atomik konumların kare kök ortalama sapması
RTK	Resptör Tirozin Kinaz
SIX1	Sine oculis homeobox homolog-1
SHBG	Seks hormonu bağlayıcı globulin
TRBP	TAR RNA bağlayıcı protein
Xpo5	Eksportin5
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Endometrial kanser gelişmiş ülkelerde kadın genital sisteminin en sık görülen invaziv neoplazmidir. Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı yüksek olan endometrial kanser, doğu ülkelerinde daha düşük bir insidansa sahip olmasına rağmen genel ölüm oranlarında artış görülmektedir [1]. Günümüzde endometrial kanser Tip-I (östrojene bağımlı) ve Tip-II (östrojen bağımsız) olarak iki kategoride sınıflandırılmaktadır [2]. Genel olarak vakaların yaklaşık %75'i Tip-I'dir, erken teşhis edilir ve iyi prognoza sahiptir. Tip-II endometrial kanser düşük sağ aklım oranı yaklaşık 5 yıldır ve metastaz eğilimi ile karakterizedir [3]. Endometrial kanser gelişimine sebep olan birçok risk faktörü bulunmasına rağmen, karşılanmamış östrojen en önemli nedendir [4].

Kanser hücrelerinde sinyal iletimi genellikle serin/tirozin kinazlar gibi sitoplazmik kinazları tetikleyen reseptör tirozin kinazların aktive edilmesiyle gerçekleşmektedir. Ancak karsinogenezde, sürekli ve kontrolsüz reseptör tirozin kinaz aktivitesi görülmektedir. Kanserlerde önemli olduğu saptanan sinyal iletim yollarından biri de fosfoditilinositol 3-kinaz (PI3K)/Protein Kinaz B (AKT) yoludur. PI3K yolağı büyüme faktörleri ile aktive olmakta ve çok sayıda önemli sinyal yolağı bileşeninin aktive edilmesini sağlamaktadır. Bu bileşenlerden biri de rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR)'dır [5] ve kanser tedavinde birçok ilacın hedefidir. Bu nedenle endometrial kanserde ağırlıklı olarak PI3K/AKT/mTOR yolunu regüle eden mikroRNA (miRNA)'ların araştırılması önemlidir.

Gen ifadesinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesinde fonksiyon gösteren, yaklaşık 23 nükleotit uzunluğunda, küçük kodlamayan RNA molekülleri miRNA olarak adlandırılmaktadır [6]. miRNA'lar, hedef geninin mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak, gen ekspresyonunun baskılanması veya engellenmesine neden olmaktadır [7]. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi ya da tam olarak bağlanabilirler. Tam bir bağlanma gerçekleşirse hedef mRNA'ları degrade eder, kısmi bağlanma olursa hedef mRNA translasyonel olarak baskılanmış olur [8]. Bu özellikleri miRNA'ları potansiyel farmakolojik hedefler haline getirmektedir. Bir miRNA birden fazla geni hedef alabilir veya bir mRNA birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilir [9]. miRNA'lar pek çok hastalıkla ilişki olup, kanser gelişimi ve ilerlemesinde de rol oynayabileceği bilinmektedir. Klinik uygulamalarda miRNA'ların potansiyel rolü erken teşhis ve tümörlerin sınıflandırılması, hayatta kalma ve tedaviye yanıt tahminini içermektedir. Ayrıca miRNA'lar kanser ile ilişkili moleküllerin ekspresyonunun kapsamlı olarak düzenlenmesi ile tedavi aracı olarak da kullanılabilir. miRNA'ların aşırı eksprese edildiği durumlarda oligonükleotid miRNA inhibitörleri veya miRNA süngerler, tersine miRNA'ların aşağı regüle edildiği durumda ise eksikliği düzeltmek için miRNA replasman tedavisi uygulanabilir [10].

Endometrial kanserde hücrel büyüme, proliferasyonu, anjiogenezi teşvik eden PI3K/AKT/mTOR yoluna etki eden miRNA'ların belirlenmesi, miRNA temelli tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Endometrial kanser tedavisinde moleküler hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için sinyal yolları üzerine etki eden miRNA'ların belirlenmesi bu yöndeki çalışmalara ışık tutabilir. Birçok kanser türünde biyobelirteç olarak kullanılan miRNA'lara yönelik çalışmalar mevcuttur. Endometrial kanserlerde de yukarı regüle ve aşağı regüle edilen bazı miRNA'ların belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada hücrel büyüme, proliferasyonu ve epidermal-mezankimal geçişi teşvik eden PI3K/AKT/mTOR yoluna etki eden miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-125-b-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-223-3'nin düzeylerinin belirlenmesiyle endometrial kanserde moleküler hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutabilmek, ayrıca hastalığın tanı ve prognozunu takibi konusunda katkı sağlamak amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Endometrial Kanser

2.1.1. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) kanser verilerine göre endometrial kanser 417000 yeni vaka ve 97000 ölümle kadınlarda en sık teşhis edilen altıncı kanserdir [11]. Endometrial kanserin Kuzey Amerika ve Avrupa'da görülme sıklığı az gelişmiş ülkelere göre on kat daha fazladır; bu bölgelerde kadın genital sistemi içinde en sık görülen kanserdir. Meme, akciğer ve kolorektal kanserlerden sonra dördüncü sıklıkta görülen kanserdir [12]. Gelişmiş ülkelerde görülme sıklığı yüksek olmasına rağmen, doğu ülkelerinde daha düşük bir insidansa sahiptir, fakat bu ülkelerde de genel ölüm oranlarında artış görülmektedir [1]. Ülkemizde ise kadınlarda ilk üç sırada görülen meme, tiroid ve kolorektal kanserden sonra gelmektedir [13].

Endometrial kanser insidansında 90'lı yılların başından itibaren (1993–2015) %56'lık keskin bir artış gözlenmiştir. Endometrial kanser için ölüm oranı, son 20 yılda %100'den fazla ve 2008'den bu yana ise %8 oranında artmıştır. Tanı sırasındaki hastaların ortalama yaşı 63'tür ve vakaların %90'ı 50 yaşın üzerindeki kadınlardır. Endometrial kanserli hastaların sadece %20'si menopozdan önce tanı almaktadır [14]. Endometrial kanser 40 yaş altı kadınlarda oldukça az gözlenir [15]. Pek çok kadın endometrial kanser tanısını menopoz sonrası almaktadır. 50 yaş öncesi tanı oranı %15, 40 yaş öncesi tanı oranı ise %5'tir [16].

Endometrial kanserde en belirgin semptom postmenopozal kanamadır. Aynı zamanda kilo kaybı, pelvik ağrı ve genital bölgede kitle gözlenebilir [17]. Tablo 2.1.'de de görüldüğü gibi geleneksel olarak, 1983 yılında Bokhman tarafından önerildiği gibi endometrial karsinomlar Tip I ve Tip II olarak sınıflandırılabilir [18]. Tip I endometrial karsinomlar vakaların yaklaşık %75'i genellikle erken teşhis edilir ve iyi bir prognoza sahiptir. Tip I endometrial kanserler, obezite ve yüksek östrojen seviyelerinin eşlik ettiği erken menopoz dönemindeki kadınlarda daha yaygındır. Tümörlerin çoğunun histolojik tipi endometrioiddir (Grade 1 veya 2) [3]. Tip II endometrial karsinomlarda yaklaşık 5 yıl düşük sağ kalım gözlenir ve çevre dokulara metastaz eğilimindedir. Postmenopozal kadınlarda yaygındır. Endokrin bozukluk veya atipik endometrial hiperplazi ile korelasyon yoktur. Grade 3 tip endometrioid tümörleri ile seröz, skuamöz, berrak hücreli tümörlerden oluşur. Östrojen ile ilişkisi hala tartışmalıdır. Bu tipin % 42,5'inde bulunan progesteron duyarlılığı düşüktür. Genellikle kötü sonucu olan yüksek dereceli karsinomlardır [19].

Tablo 2.1. Endometrial kanser türleri ve özellikleri

Özellik	Tip I	Tip II
Östrojen Rolü	Var	Yok
Yaş grubu	Premenopozal erken menopoz dönem	Geç menopoz sonrası dönem
Vücut kütlesi indeksi (BMI)	Yüksek	Düşük
Parite	Çoğunlukla nullipar	Çoğunlukla multipar
Endometrial hiperplazi	Mevcut olabilir	Yok
Geliştiği zemin	Premalign endometrium	Atrofik endometrium
Histolojik ırksal dağıtım	İyi farklılaştırılmış Çoğunlukla beyaz Kadınlar	Kötü farklılaştırılmış Çoğunlukla siyah Kadınlar
Diferansiyasyon	İyi (grade 1-2)	Az (grade 3)
Progesteron tedavi	Çoğunlukla duyarlı	Yanıt yok
Prognoz	İyi	Kötü
Tipik histoloji	Endometrioid	Seröz papiller ve şeffaf hücreli
Mutasyon Türü	PTEN mutasyonu	p53 mutasyonu

Tip I endometrial karsinom, esas olarak östrojene duyarlıdır. Yeterli progesteron desteği olmaksızın aşırı endojen veya eksojen östrojene uzun süre maruz kalmak en önemli risk faktörüdür. Aşırı östrojen maruziyetine yol açan nulliparite, diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi bazı faktörler endometrial kanserle ilişkilendirilebilir [18].

Tablo 2.2. Tip I endometrial kanser risk faktörleri

1-Endojen Östrojen Maruziyeti	2-Eksojen Östrojen Maruziyeti	3-Diğer Faktörler
a) Obezite	a) Postmenopozal progesteronsuz östrojen tedavisi	a) Artan Yaş
b) Kronik Anovulasyon	b) Tamoksifene bağlı	b) Erken menarş, geç menopoz
c) Östrojen Salgılayan Tümörler		c) Nulliparite
		d) Polikistik over sendromu (PKOS)
		e) Diabetes Mellitus
		f) Lynch Sendromu
		g) Cowden Sendromu
		h) Aile Öyküsü

Obezite, endometrial karsinom için uzun süredir bilinen bir risk faktörüdür ve birçok çalışmada doğrulanmıştır. Vücut kitle indeksinde (BMI) 5 kg/m² artış ile endometrial kanser başlangıcı arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirilmiştir. Premenopozal kadınlarda aşırı kilo insülin direncine, yumurtalıkta androjen fazlalığına, anovulasyona ve kronik progesteron eksikliğine neden olmaktadır. Postmenopozal kadınlarda androjenlerin ekstrasgladüler dönüşümünden dolayı dolaşımında daha yüksek östrojen konsantrasyonu meydana gelir [20].

Anovulatuar kadınlarda da seks steroid hormonları üretilir. Fakat döngüsel üretilmez. Bu durum düzensiz uterus kanamasına yol açar. Ayrıca, progesteron tarafından karşılanmayan kronik östrojen üretimi, endometriumun proliferasyonuna neden olur. Kronik anovulasyon endometrial hiperplaziye ve sonunda endometrial karsinoma neden olabileceği belirtilmektedir. [21].

Bazı yumurtalık tümörleri östrojen üretir ve çalışmalarda endometrial karsinoma yol açtığı belirtilmiştir. Granüloza hücreli tümörler, endometrial neoplazi ile ilişkili olma olasılığı en yüksek olanlardır. Yumurtalığın granüloza hücreli tümörü, endometrial hiperplazinin %25-50'si ve endometrial karsinomun %5-10'u ile ilişkilidir. Granüloza-stromal hücreli tümörlerle ilişkili karsinomlar genellikle erken evrededir ve iyi diferansiyedir [22].

Bir yıl boyunca progestinsiz sistemik östrojen tedavisi uygulanan kadınların %20-50'sinde endometrial hiperplazi gelişir [23]. Bu risk, bir progestinin birlikte uygulanmasıyla önemli ölçüde azaltılabilir. Östrojen kullanımının dozu ve süresi ile ilişkili olan östrojen maruziyeti ile endometrial karsinom insidansında %1 ile 1.5 arasında bir artış görülmüştür [24].

Meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen, östrojene karşı hem agonist hem de antagonist özelliklere sahiptir. Etkisi bireysel hedef organa ve serum östrojen düzeyine bağlıdır. Meme dokusunda östrojen uyarısını bloke ederek meme kanseri tekrarının önlenmesi ve tedavisinde kullanılır. Tamoksifen kullanımı postmenopozal kadınlarda endometrial kanser riskini artırırken, premenopozal kadınlarda risk kanıtlanamamıştır [25].

Artan yaş endometrial kanser riskini artırır. Endometrial karsinom en sık postmenopozal kadınlarda görülür. Premenopozal dönemden itibaren prevalansı giderek artar ve menopoiz sonrası kadınlarda maksimum risk görülür; 70 yaşından sonra ise risk azalır [26].

Çeşitli çalışmalarda erken yaşta menarşın, endometrial karsinom ile ilişkili bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir. Ancak geç menopozun hastalık riskinin artmasıyla ilişkili olduğuna dair kanıtlar daha azdır [27]. Bu faktörlerin her ikisi de, anovulatuar döngülerin yaygın olduğu uzun süreli östrojen maruziyeti ile sonuçlanmaktadır.

Parite ile endometrial kanser riski arasında ters bir ilişki vardır. Nulliparite ve infertilite riski artırır [28].

Polikistik over sendromu (PKOS), oligomenore ve hiperandrojenizm şeklinde kronik anovulasyon ve adet düzensizliklerinden oluşan bir hastalıktır. Endometrial kanser ve PKOS ile ilişkili anovülasyon arasında güçlü bir ilişki vardır. Bununla birlikte, PKOS'lu kadınlarda endometrial kanser ile de ilgili başka risk faktörleri de vardır. PKOS'un endometrial kanser için bir risk faktörü olduğu konusu çelişki olsa da PKOS ve endometrial kanser arasındaki ilişkinin menopoz öncesi kadınlarla sınırlı olabileceğini bildirilmektedir [29]

Mortalite ile ilişkisi zayıf olmasına rağmen, diabetes mellitusun endometrial kanser riskini artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Hiperinsülinemi, doğrudan mitojenik etkiler yoluyla veya seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) seviyelerinde bir azalma yoluyla biyolojik olarak kullanılabilir östrojen seviyelerini artırarak; endometrial kansere neden olabilmektedir [30].

Lynch sendromu, ailesel bir tümör sendromudur ve kalıtsal nonpolip kolorektal kanser (HNPCC) olarak da bilinir. Otozomal dominant bir hastalıktır. Lynch sendromlu kadınlarda %25 ile %60 arasında değişen endometrial kanser riski vardır. Genel popülasyonda kadınlarda endometrial karsinom tanı yaşı ortalama 61, Lynch sendromlu kadınlarda ise 46-54 yaşdır. Lynch sendromu ile ilişkili endometrial karsinomların çoğunluğunun histolojisi endometrioiddir ve sporadik endometrial karsinom gibi erken bir aşamada ortaya çıkar. Lynch sendromuna, DNA mismatch onarım genlerinden birindeki mutasyon vardır. Bu mutasyon kolon ve over kanseri riskini artırır. MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2 genlerinin mutasyonu Lynch sendromu ile ilişkilidir. Ancak MSH6 geninin mutasyonu endometrial kanser riski ile önemli ölçüde ilişkilidir [31].

Otozomal dominant bir hastalık olan Cowden sendromu PTEN tümör baskılayıcı genindeki mutasyon nedeniyle oluşur. Cowden sendromu meme, tiroid ve endometrial kanserlerle ilişkilidir. Bu hastalığa ilişkin veriler çok daha azdır, ancak yine de farklı çalışmalarda yaşam boyu endometrial kanser riski %13-19 olarak kaydedilmiştir [32].

Birinci derece akrabalar için endometrial kanser için aile öyküsü önemli bir risk faktörüdür, ancak henüz aday gen tanımlanmamıştır. Aile öyküsü olan bireylerde erken yaşta (<50 yaş) endometrial kanser gelişme riski bulunmaktadır [33].

Benzer genetik yatkınlığa sahip meme kanseri ile endometrial kanser arasındaki ilişki çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Meme kanseri öyküsü endometrial kanser riskini arttırmaktadır. Bu risk artışının nedeni olarak meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen

kullanımı görülmektedir [34]. BRCA genlerindeki mutasyonların meme ve yumurtalık kanserleri ile ilişkisi bilinmektedir, ancak endometrial kanserin BRCA1 genindeki mutasyonlarla ilişkisi belirgin değildir. Düşük oranda risk artışı varmış gibi görünse de muhtemelen bu artışın nedeni tamoksifen kullanımıdır [35]

Tip II endometrial karsinomlar ileri yaşta ortaya çıkma eğilimindedir. Olası mekanizma endometrial hücrelerde p53 geninin mutasyonudur. Tip II endometrial karsinomlar hakkında tip I karsinomlardan daha az epidemiyolojik veri vardır. Artan BMI'nin Tip II endometrial kanser gelişimi için de bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir. 25 yıllık bir takipte aşırı kilolu ve obez kadınların, normal kilolu kadınlara kıyasla Tip II endometrial kanser geliştirme olasılığının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Fakat obezite tip I endometrial kanser için daha güçlü bir risk faktörüdür. Aynı çalışmada meme kanseri öyküsünün de tip II endometrial kanser için risk faktörü olduğu bildirilmiştir [36].

2.1.2. Endometrial Kanserde Sınıflandırma ve Derecelendirme

Geleneksel olarak endometrial karsinomlar Bokhman sınıflandırmasında klinik ve hormonal özelliklerine göre Tip I (endometrioid) ve Tip II (non-endometrioid) olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Endometrial karsinomlar histolojik olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırma sistemine Tablo-2.3'te gösterildiği gibi sınıflandırılmıştır.

Tablo 2.3. Endometrial kanser WHO histolojik sınıflandırması [37].

1- Endometrioid Adenokarsinom
1.1- Skuamöz Diferansiyon gösteren varyant
1.2- Villoglandüler varyant
1.3- Sekretuar Varyant
1.4- Silyalı Hücreli Varyant
2- Müsinöz Adenokarsinom
3- Seröz Papiller Adenokarsinom
4- Berrak Hücreli Adenokarsinom
5- Miks Hücreli Adenokarsinom
6- Skuamöz Hücreli Karsinom
7- Küçük Hücreli Karsinom
8- Transizyonel Hücreli Karsinom
9- Andifferansiye Karsinom
10- Diğerleri

Endometrioid karsinomlar, endometriumun en sık görülen epitelyal tümörleridir. Endometrioid karsinom tüm endometrial kanserlerin %70 ila %80'ini oluşturur. Karşılanmamış östrojene bağlı hiperplazi zemininde gelişirler [38]. Seröz karsinomlar ise tüm endometrial kanserlerin %10'unu oluşturan ikinci en yaygın histolojik alt tiptir. Seröz karsinomlar oldukça agresiftir [39]. Endometrial berrak hücreli karsinom da tüm endometrial kanserlerin <%6'sını

oluşturur [40]. Endometrial berrak hücreli karsinom Tip II tümörlerin tipik özelliklerine sahipken, hormonla ilişkili değildir, atrofik endometriyum ile ilişkilidir ve genellikle agresif davranış ve kötü prognoz sergiler [41].

Endometrioid karsinomlar histopatolojik olarak üç sınıfta derecelendirilmiştir. Tümörün solid büyüme alanı %5'in altında ise Grade 1 (G1), %6-50 ise Grade 2 (G2) ve %50'nin üzerinde ise Grade 3 (G3) olarak derecelendirilir. [42] Grade 1 iyi diferansiye ve iyi prognoza, grade 2 orta derece diferansiye ve orta derece bir prognoza, grade 3 endometrioid karsinomlar ise undiferansiye ve kötü prognoza sahiptirler [43]. Grade 1 ve 2 düşük dereceli, grade 3 endometrial kanserler ise yüksek dereceli olarak tanımlanmaktadır.

Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) endometrial kanseri cerrahi olarak 4 evreye ayırmıştır.

Tablo 2.4. FIGO evrelemesi [44]

Evre	
Evre I	Tümör korpusa sınırlı
IA	Endometriuma sınırlı hastalık veya agresif olmayan histotiplerde LVSI (lenfovasküler invazyon) olmayan ya da fokal olan olgularda iç myometrial invazyon veya iyi prognozlu hastalık.
IA1	Agresif olmayan histolojik tip, endometriyal poliple sınırlı veya endometriyumla sınırlı.
IA2	Miyometriyumun yarısından azını kapsayan, agresif olmayan histotiplerde LVSI olmayan ya da fokal olan olgularda iç myometrial invazyon.
IA3	Uterus ve overde sınırlı olan düşük dereceli endometrioid karsinomlar.
IB	Agresif olmayan histotiplerde LVSI olmayan ya da fokal olan olgularda yarısından fazla myometrial invazyon.
IC	Agresif histolojik tipler, poliple sınırlı veya endometriyumla sınırlı.
Evre II	Ekstrauterin yayılım olmadan servikal stroma invazyonu veya önemli LVSI ile veya miyometrial invazyonun olduğu agresif histolojik tipler.
IIA	Servikal stromal ivazyon.
IIB	Agresif olmayan histolojik tiplerde önemli LVSI.
IIC	Myometrial invazyonu olan agresif histotipler.
Evre III	Herhangi bir histolojik alt tipteki tümörün lokal ve/veya bölgesel yayılımı.
IIIA	Uterin seroza, adneks ya da her ikisinin tutulumu, direk invazyon ya da metastaz. IIIA1: Over ya da fallop tüpü yayılımı. (Evre IA3 dışında kalan olgular) IIIA2: Uterin subseroza tutulumu ya da uterus seroza yayılımı.

Tablo 2.4. FIGO evrelemesi [44] (devamı)

IIIB	Vajen ve/veya parametrial tutulum ya da metastaz, pelvik periton yayılımı. IIIB1: Vajen ve/veya parametriuma direk invazyon ya da metastaz. IIIB2: Pelvik peritona metastaz
IIIC	Pelvik ve/veya paraaortik lenf nodu metastazı. IIIC1: Pelvik lenf düğümlerine metastaz (IIIC1i: Mikrometastaz, IIIC1ii: Makrometastaz) IIIC2: Pelvik lenf düğümlerine metastaz olsun ya da olmasın renal damarlara kadar para-aortik lenf düğümlerine metastaz. (IIIC2i: Mikrometastaz, IIIC2ii: Makrometastaz)
Evre IV	Mesane mukozasına ve/veya bağırsak mukozasına yayılma ve/veya uzak metastaz
IVA	Mesane mukozasının ve/veya bağırsak mukozasının invazyonu.
IVB	Pelvisin ötesinde karın peritoneal metastazı.
IVC	Böbrek damarları, akciğerler, karaciğer, beyin veya kemik üzerindeki ekstra veya intraabdominal lenf düğümlerine metastaz dahil uzak metastaz.

2013 yılında kanser genom atlası (The Cancer Genome Atlas =TCGA), düşük ve yüksek dereceli endometrioid ve seröz tümörler dahil olmak üzere 373 endometrial kanserin entegre genomik karakterizasyonunu gerçekleştirdi [45]. Bu sınıflandırmaya göre dört sınıfa ayrılmaktadır:

- **Grup 1 POLE Mutant;** DNA polimeraz epsilon (POLE) endonükleaz domaininde mutasyon ya da ultra mutasyona uğramış alt gruptur.
- **Grup 2 MSI Hypermütanat;** mikrosatellit instabil (MSI) ya da hipermutasyona uğramış gruptur.
- **Grup3 Kopya sayısı düşük** (copy-number low)
- **Grup 4 Kopya Sayısı yüksek** (copy-number high)

Tablo 2.5. TCGA genomik alt tiplerinin moleküler ve patolojik özellikleri [38]

Alt grup	Moleküler karakter	Patolojik ve klinik özellikler
POLE mutant (7%)	POLE eksonükleaz alanındaki (DNA replikasyonu ve onarımında yer alan katalitik alt birim) yanlış anlamlı mutasyon; çok yüksek mutasyon oranlarına yol açar (ultramutasyonlu) Tipik mutasyonlar: PTEN, PIK3R1, PIK3CA, FBXW7, KRAS, ARID 1A, ARID 5B	Endometrioid histolojik tipe sahip, prognoz iyi.

Tablo 2.5. TCGA genomik alt tiplerinin moleküler ve patolojik özellikleri [38](devamı)

Alt grup	Moleküler karakter	Patolojik ve klinik özellikler
Mikrosatellite instabilitesi (MSI) (28%)	MSI mutasyonuna vardır, hatalı eşleşme onarımına yol açarak; yüksek mutasyon oranlarına (hipermutasyona) sahiptir. RTK/RAS/ β -katenin yolunda (%70) ve PIK3CA/PIK3R1-PTEN yolunda (%95) değişiklikler mevcuttur.	Endometrioid histolojik tipe sahip, prognoz orta.
Kopya Sayısı Düşük (Copy-number Low)(39%)	PI3K yolunda sık değişiklikler (tümörlerin %92'si), RTK/RAS/ β -katenin yolunda değişiklikler (%83) ve CTNNB1'de somatik mutasyonlar gözlenir. Ayrıca PIK3CA, PIK3R1, ARID 1A.	Bu grup 1. ve 2. Grade endometrioid kanserlerin çoğunu temsil eder ve orta derece prognoza sahiptir.
Kopya Sayısı Yüksek (Copy-number High), Seröz benzeri (26%)	Sık p53 mutasyonları (%90), MYC ve ERBB2 onkogenlerinin amplifikasyonları ile yüksek derecede somatik kopya numarası değişiklikleri vardır.	Çoğunlukla endometrioid yüksek dereceli tümörlerde gözlenir ve tümü kötü prognoz gösterir. Seröz ve mikst histolojik gruplar da bulunabilir.

2.1.3. Endometrial Kanserde Genetik Değişiklikler

Tip I ve Tip II endometrial kanserlerdeki genetik değişiklikleri görülme oranı birbirinden farklı olmakla birlikte bu değişiklikler ayırt edici olarak kullanılabilir. Bu değişiklikler Tablo 2.6.' da verilmiştir.

Tablo 2.6. Tip I ve Tip II endometrial kanserlerdeki genetik değişiklikler

Değişiklik	Tip I	Tip II
PTEN inaktivasyonu	%57-83	%10
PIK3CA mutasyonu	%50	%30
KRAS mutasyonu	%10-30	%0-10
β -Katenin (CTNNB1) mutasyonu	%31-47	%0-3
Mikrosatellit İnstabilitesi	%25-45	%0-14
p53 mutasyonu	%17	%90
HER2/neu amplifikasyonu	%3	%17-50
p16 inaktivasyonu	%10	%40-45
E-Kadherin kaybı	%12	%60

2.1.3.1. Tip 1 Endometrial Kanserlerde Genetik değişiklikler

a) Fosfataz ve Tensin Homologu (PTEN)

Endometrioid endometrial karsinomda en sık mutasyona uğrayan gen olan PTEN'dir. PTEN, bir tümör baskılayıcı gen gibi davranır, kromozom 10q23.3 üzerinde bulunur ve PI3K'nın ürünü olan PIP3'ü fosforile ederek; PI3K/AKT yolunu antagonize eden bir lipit fosfatazı kodlar. Azalan PTEN aktivitesi, sinyal iletim yollarının modülasyonu yoluyla hücre çoğalmasının ve hayatta kalmasının artmasına neden olur.

Bu mutasyonda PI3K/AKT/mTOR aktivasyonunun artmasına neden olmaktadır. PTEN, mutasyon, heterozigozite kaybı (loss of heterozygosity; LOH) ve promotör hipermetilasyonu gibi çeşitli mekanizmalar tarafından etkisiz hale getirilebilir [46]. PTEN kaybı endometrial kanser öncesi lezyonlarda görülebilmektedir ve muhtemelen bilinen hormonal risk faktörlerine yanıt olarak meydana gelmektedir. PTEN mutasyonu, atipi olan ve olmayan endometrial hiperplazide belirgin şekilde görülmektedir [47].

b) PI3K'nın p110 α Katalitik Alt Birimi (PIK3CA)

PIK3CA geni, 3q26.32 kromozomu üzerinde bulunur. Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K), PI3K/AKT sinyal yolunda bir katalitik alt birimden (p110) ve bir düzenleyici alt birimden (p85) oluşan heterodimerik lipit kinazdır. Bu yol, endometrial karsinomda çeşitli genetik değişiklikler ve bunların kombinasyonları yoluyla sıklıkla aktive edilir. PI3K'nın aktivasyonu, AKT gibi çeşitli aşağı akış yollarını aktive eden ikinci haberci PIP3'ü üretir. Bu düzenleme, apoptozun baskılanmasını ve hücre proliferasyonunun arttırılmasına neden olur [2]. PIK3CA'daki mutasyonlar tüm vakaların %24-36'sında meydana gelir ve bunların %14-26'sında PTEN mutasyonları ile birlikte bulunur[48]. PIK3CA mutasyonları PTEN ve KRAS mutasyonları ile birlikte bulunabilir. PIK3CA'daki mutasyonlar, tip I endometrial kanserlerde %50 üzeri ve tip II endometrial kanserlerde ise %30 oranında bildirilmiştir. [49]

c) PI3K'nın p85a Düzenleyici Alt Birimi (PIK3R1)

Endometrial kanserde PI3K'nın düzenleyici alt birimi olan p85a'yı kodlayan PIK3R1'deki mutasyonlara bağlı olarak da PI3K/AKT/mTOR yolu aktive olabileceği bildirilmiştir. PIK3R1, endometrioid karsinomların %43'ünde, non-endometrioid karsinomların ise %12'sinde somatik olarak mutasyona uğramıştır. Non-endometrioid karsinomlardan, seröz karsinomların %8'i ve berrak hücreli karsinomların %20'sinde mutasyona gözlenmiştir. Fakat PIK3R1 mutasyonları ile tümör evresi veya derecesi arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmemiştir [50].

d) Protein Kinaz B (AKT)

Endometrial karsinomda AKT ailesi üyelerindeki AKT1 (D399N), AKT2 (D32H) ve AKT3 (E438D) mutasyonları ve bunların diğer gen değişiklikleriyle korelasyonları bulunur. AKT3 (E438D) mutasyonları ayrıca PIK3CA'da amplifikasyon ve mutasyonla birlikte görülür. AKT1 E17K mutasyonu, PTEN veya PIK3CA genomik değişikliği ile ilişkili değildir [51].

e) Kristen Rat Sarcoma Virus Geni (KRAS)

KRAS, kromozom 12'de (12p12.1) bulunan bir proto-onkogendir ve esas olarak hücre dışı sinyallere hücresel yanıtta yer alır. KRAS mutasyonları endometrioid endometrial karsinomların %10-30'unda tanımlanmıştır [52] seröz ve berrak hücreli karsinomlarında KRAS mutasyonlarının çok az olduğu bildirilmiştir [53]. KRAS mutasyonları, endometrial hiperplazilerde, endometrioid endometrial karsinomlardaki benzer bir oranda görülmektedir. Bu durum KRAS mutasyonlarının endometrial karsinogenezde erken bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir [52].

f) β -Katenin (CTNNB1)

E-cadherin protein biriminin bir bileşeni olan β -katenin, hücre farklılaşması ve normal doku mimarisinin korunması için gereklidir ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynar. β -katenin ayrıca Wnt sinyal iletim yolunda bir aşağı akış transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapar. β -katenin nükleer birikimi endometrioid lezyonlarda (%31 ila %47) non-endometrioid histolojiye (%0 ila %3) kıyasla daha yaygındır [54].

g) Mikrosatellit İnstabilitesi

Mikrosatellit DNA dizileri, genom boyunca dağılmış polimorfik, kısa ardışık tekrarlardır. DNA replikasyonu sırasında hatalı olarak; karşı zincire eş nükleotid gelmediğinde DNA yanlış eşleşme onarım enzimleri tarafından onarılır. Mikrosatellit instabilitesi (MSI), DNA replikasyonu sırasında oluşan hataları onaran MMR genler; MLH1, MSH2, MSH6 ve PMS2'nin mutasyonları veya MLH1'in epigenetik olarak susturulması nedeniyle DNA onarım (MMR) sisteminde kusurları nedeniyle meydana gelir [55]. MSI'nin endometrial kanserlerin %3-43 'inde görüldüğü bildirilmektedir [56]. Tip I endometrial kanserlerde %25-45 oranında görülmesine rağmen tip II endometrial kanserlerde bu oran çok daha azdır (%0-14) [57].

2.1.3.2. Tip 2 Endometrial Kanserlerde Genetik Değişiklikler

a) p53 Geni

p53, DNA hasarı olan hücrelerin çoğalmasını önleyen tümör baskılayıcı bir gendir. DNA hasarından sonra, p53 proteini çekirdekte birikir ve Rb geninin siklin-D1 fosforilasyonunu

inhibe ederek hücre döngüsünün durdurulmasını tetikler, böylece apoptozu teşvik eder [58]. p53 mutasyonları, tüm non-endometrioid karsinomların yaklaşık %90'ında bulunur ve Tip II endometrial karsinomlarda en yaygın genetik değişiklikleri oluşturur. Bunun aksine, endometrioid karsinomların sadece %17'sinde p53 mutasyonları gözlenmiştir [59]. p53'ün aşırı ekspresyonu, yüksek histolojik derece ve ileri aşamanın yanı sıra kötü prognoz ile ilişkilidir [60].

b) Epidermal büyüme faktörü reseptörü II (HER2/neu)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü II veya HER2/neu, hücre sinyallemede yer alan ve insan kromozomu 17q12'nin uzun kolunda yer alan bir transmembran reseptör tirozin kinazı kodlayan bir onkogendir. HER2 ve gen amplifikasyonu, Tip II tümörlerin sırasıyla %17-80 (HER2 aşırı ekspresyonu) ve %17-50'sinde (HER2 gen amplifikasyonu), tip I tümörlerde %9 (HER2 aşırı ekspresyon) ve %3 (HER2 gen amplifikasyon) gözlenmiştir. HER2/neu aşırı ekspresyonu hücre membranında HER2 reseptörlerindeki artışı, HER2 amplifikasyonu ise HER2 gen kopya sayısında artışı ifade etmektedir. Endometrial kanserde anormal HER2/neu ekspresyonu seröz ve berrak hücreli karsinomlarla ilişkilendirilmiştir [61].

c) p16 Geni

p16, hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. 9p21 kromozomu üzerinde yer alan bir tümör baskılayıcı gendir [62]. p16 inaktivasyonu, kontrolsüz hücre büyümesine yol açabilir. p16'nın inaktivasyonu endometrioid olmayan endometrial karsinomda (%40-45) endometrioid endometrial karsinomdan (%10) daha sıktır [62,63]. p16 ekspresyonunun kaybı, KRAS ve p53 mutasyonları ile ilişkilidir ve yüksek evre, yüksek grade ve düşük sağkalım ile ilişkilidir [62].

d) E-Kadherin

E-kadherin, CDH1 geni tarafından kodlanır ve 16q22.1 kromozomu üzerinde yer alır. Tümör baskılayıcı e-kadherin kaybı tümör istilası ve metastazı teşvik etmektedir. E-kadherin'in azalmış ekspresyonu endometrial karsinomda sık görülür ve LOH veya promotor hipermetilasyondan kaynaklanabilir. 16q22.1'deki LOH, non-endometrioid endometrial karsinomun neredeyse %60'ında, endometrioid endometrial karsinomun ise %22'sinde görülür [63].

2.1.4. Endometrial Kanserde Biyobelirteçler

Rutin uygulamalarda endometrial kanseri erken evrede teşhis edebilecek, etkili bir şekilde kullanılan bir tarama testi bulunmamaktadır. Serum Cancer Antigen 125 (CA-125) sınırlı bir tanısal doğruluğa, ancak çok iyi prognostik özelliklere sahiptir. Bu nedenle

endometrial kanserli hastaların preoperatif değerlendirilmesi için prognostik bir belirteç olarak önerilmektedir. CA-125 seviyesi (>35 U/ml), endometrial karsinomlu hastaların %11-34'ünde yüksek bulunmuştur [64]. Preoperatif serum antijen konsantrasyonları evre, miyometriyal invazyon derinliği, tümör derecesi, servikal invazyon, peritoneal sitoloji ve lenf nodu durumu ile ilişkilidir. Fakat CA-125 seviyeleri hamilelik, menstrüasyon, endometriozis, rahim fibroidleri, yumurtalık kanseri, yumurtalık iyi huylu kistleri ve ayrıca karın ameliyatı, peritonit ve zatürre dahil olmak üzere bir dizi fizyolojik ve patolojik jinekolojik ile jinekolojik olmayan durumda yükselir. Ayrıca yaş da CA-125 düzeylerini etkiler. Bu nedenle, CA-125 verileri analiz edilirken bu değişkenlerin uygun şekilde dikkate alınması gerekir [65].

İnsan epididimal proteini E4 (HE-4), yumurtalık karsinomu için umut vadeden yeni bir biyobelirteçtir ve özellikle evre I endometrial kanser için en yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir [66]. HE-4'ün hastalığın tüm evrelerinde yükselmekle birlikte erken evre endometrial kanserde serum CA125'den daha duyarlıdır. Serum HE-4 seviyeleri yaş, menopoz durumu, vücut kitle indeksi, sigara içme durumu ve kreatin seviyeleri ile ilişkili olduğundan HE-4 verileri analiz edilirken bu değişkenler dikkate alınmalıdır. HE-4'ün biyobelirteç olarak kullanımı için daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç vardır [67].

Serum CA15.3 seviyelerinin, endometrial karsinomlu hastaların %24-32'sinde yükseldiği ve tümör evresi ile korelasyon gösterdiği bildirilmektedir ve kötü prognozla ilişkilidir [68].

2.2. PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolu

Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)/Protein kinaz B(AKT)/memeli rapamisin hedefi (mTOR) sinyali, hücre büyümesini, hareketliliğini, hayatta kalmasını, metabolizmayı ve anjiyogenezi düzenleyen en önemli hücre içi yollardan biridir [69]. PI3K/AKT/mTOR yolunun aktivasyonu, tümör gelişimine ve antikanser tedavilerine karşı direnç gelişimine katkıda bulunur. PI3K/AKT/mTOR yolu, epidermal büyüme faktörü (ErbB) ailesi reseptörleri, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R) gibi transmembran tirozin kinaz büyüme faktörü reseptörleri tarafından aktive edilebilir [70]. Ayrıca aktive edilmiş RAS gibi G proteinine bağlı reseptörler, katalitik alt birimi aracılığıyla PI3K'yı uyarabilir [71].

2.2.1. Fosfatidilinositol 3-kinaz

Fosfatidilinositol 3-kinazlar (PI3K), fosfoinositidlerin 3'-OH grubunu fosforile etme yetenekleri ile karakterize edilen bir lipid kinaz ailesini oluşturur. Üç PI3K sınıfı (sınıf I, sınıf II ve sınıf III) tanımlanmıştır. Sınıf I PI3K'ler sınıf IA (p110 α , p110 β ve p110 δ) ve sınıf IB'ye (p110 γ) olmak üzere ikiye ayrılır. Sınıf I PI3K'lerin kanserde etkin rol oynadığı bilinmektedir. Sınıf II PI3K, üç farklı enzimi (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β ve PI3K-C2 γ) içerir. Sınıf III PI3K'ler; PI3KC3 olarak da bilinen Vps34'den oluşurlar [70].

a) Sınıf IA PI3K

Bir p110 katalitik alt birimden ve bir p85 düzenleyici alt birimden oluşan heterodimer yapıdadır. Düzenleyici alt birim, enzimin reseptöre bağlanmasına, aktivasyonuna ve lokalizasyonuna aracılık eder. Memelilerde PIK3R1, PIK3R2 ve PIK3R3 genleri p85 α p85 β ve p55 γ düzenleyici alt birimleri kodlar. Katalitik alt birim izoformları p110 α , p110 β ve p110 δ sırasıyla PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genlerinin ürünleridir. Aktive edilmiş p110 katalitik alt birimi, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP₂)'ı fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP₃)'a dönüştürür, bu da birden fazla aşağı akış sinyal yolunu etkinleştirir [72].

b) Sınıf IB PI3K

Bir katalitik alt birim p110 γ ve bir düzenleyici alt birim p101 oluşan bir heterodimer yapıdadır. p110 γ , düzenleyici alt biriminin trimerik G proteinlerinin G $\beta\gamma$ alt birimi ile etkileşimi yoluyla doğrudan G proteini kenetli reseptörler (GPCR) tarafından aktive edilir. p110 γ esas olarak lökositlerde ifade edilir, ancak kalp, pankreas, karaciğer ve iskelet kaslarında da bulunur [73].

c) Sınıf II PI3K'ler

Substrat olarak tercihen PI veya PIP₄ kullanan, tek katalitik alt birimden oluşan PI3K sınıfıdır. Reseptör tirozin kinazlar (RTK), sitokin reseptörleri ve integrinler tarafından aktive edilebilirler. Sınıf II PI3K'lerin üç izoformu, PI3KC2 α , PI3KC2 β ve PI3KC2 γ vardır [69].

d) Sınıf III PI3K

Tek bir katalitik Vps34 (vakuolar protein sınıflandırma kusurlu 34 homologu) alt biriminden oluşur. Vps34; membran transferinin önemli bir düzenleyicisi olan PIP₃'yi üretir ve mTOR aracılığıyla sinyalleşmeye aracılık eden, besin tarafından düzenlenen bir lipid kinaz olarak işlev görmektedir. Besin açlığına hücrel bir yanıt olan otofajinin önemli bir düzenleyicisi olarak da rol oynamaktadır [74].

2.2.2. Protein Kinaz B (AKT)

Protein kinaz B olarak da bilinen, sırasıyla PKB α , PKB β ve PKB γ genleri tarafından kodlanan AKT1, AKT2 ve AKT3 olmak üzere üç izoform olarak ifade edilen bir serin/treonin kinazdır. Üç izoformun tümü benzer bir yapıya sahiptir: bir N-terminal PH (plekstrin homoloji) alanı, bir merkezi serin/treonin katalitik alanı ve küçük bir C-terminal düzenleyici alandan oluşur. AKT aktivasyonu PIP₃'ün AKT N-terminal bölgesinde PH alanına bağlanmasıyla membranda translokasyonu ile başlatılır. Bu durum AKT'nin konformasyonel değişim ile sonuçlanır. Bu fosforilasyon olayında, 3-fosfoinozotid-bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) tarafından AKT'nin Thr308 bölgesinden ve 3-fosfoinozotid-bağımlı protein kinaz 2 (PDK2) ise AKT'nin Ser473 bölgesinden fosforile eder. ILK (integrin bağlantılı kinaz), protein kinaz C beta II (PKC β II), DNA-PK (DNA'ya bağımlı protein kinaz), ATM (ataksi telenjipektazi mutasyona uğramış) ve AKT'nin kendisi dahil olmak üzere bir dizi potansiyel PDK2 tanımlanmıştır. Ancak mTORC2'nin (mTOR/rictor kompleksi) çoğu durumda PDK2 aktivitesinin birincil kaynağı olduğu düşünülmektedir. Fosforile olarak aktive olmuş AKT, glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) ve forkhead box transkripsiyon faktörleri ailesi (FOXO) gibi birçok başka proteini fosforile eder, böylece protein sentezi, hücre hayatta kalması, çoğalma ve metabolizma ile ilgili çok çeşitli hücresel süreçleri düzenler [75].

2.2.3. Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi

Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), besin mevcudiyetini, hücrel enerji ve oksijen seviyelerini, ayrıca mitojenik sinyalleri izleyerek; hücre büyümesi ve çoğalmasının düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. mTOR iki farklı komplekste bulunur: mTORC1 ve mTORC2. mTORC1 kompleksi; mTOR katalitik alt birimi, mTOR'un düzenleyici ilişkili proteini (Raptor), prolin açısından zengin AKT substratı 40 kDa (PRAS40), protein mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8, diğer adı GbL) ve DEP- domain-containing mTOR-interacting proteinden (Deptor) oluşur. mTORC2 kompleksi ise mTOR katalitik alt birimi, mTOR'un rapamisine duyarsız proteini (Rictor), memeli stresi ile aktive olan protein kinaz etkileşimli protein 1 (mSIN1), mLST8(GbL), Protor-1 ve Deptor'den oluşur [76].

AKT hem PRAS40 ve tüberoskleroza kompleks 2 (TSC2), hem de TORC1 üzerindeki inhibe edici etkilerini hafifletmek için fosforlayarak mTOR aktive edebilir. mTORC1'in TSC1 ve TSC2 ile ilişkisinin bulunması, mTOR ve kanser arasında moleküler bir bağlantı sağlar. mTORC1'in en iyi karakterize edilen akış aşağı hedefleri, her ikisi de protein sentezinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan p70S6 kinaz (S6K1) ve 4E-bağlayıcı protein (4E-BP1)'dir. Bu nedenle, mTOR'un aktivasyonu, protein sentezini teşvik ederek tümör hücrelerine

büyüme avantajı sağlayabilir. mTORC2 kompleksinde Rictor'a bağlandığında, mTOR, AKT'yi fosforile etmek için PDK2 işlevi görür [77].

2.2.4. Hücre Sağkalımı ve Kemoterapötik Dirençte PI3K/AKT/mTOR Yolu

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu birçok kanserde anormal şekilde aktive edilerek; apoptoz düzensizliğine ve kemoterapötik dirence neden olur. Apoptoz sürecinde Bcl-2 protein ailesi kanser sağkalımına ve çoklu ilaç direncine katkıda bulunan ana faktördür. Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal membranın geçirgenliğini değiştirerek sitokrom C'nin salınmasına ve kaspaz aktivasyonunun aracılık ettiği hücre ölümüne yol açar [70].

X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörünün (XIAP) AKT sinyali tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Aktive XIAP, kaspaz aktivitesine doğrudan katılır ve inhibe eder; sonuç olarak, apoptoz süreci baskılanır. AKT fosforilasyonu yoluyla XIAP'yi stabilize edilir ve bu mekanizma sisplatin kaynaklı hücre ölümünü inhibe edebilir [78].

Tümör baskılayıcı p53'ün bir negatif düzenleyicisi olan mouse double minute 2 homolog (MDM-2) da AKT tarafından Ser166 ve Ser186'da fosforile edilir. Fosforillenmiş MDM-2, ubiquitination prosesiyle p53 degradasyonuna aracılık eder, p53'ün N-terminal transaktivasyon alanına bağlanır ve bloke eder. p53 proapoptotik BAX transkripsiyonundan sorumlu olduğu için p53'ün parçalanması, hayatta kalma ve proapoptotik proteinler arasındaki dengeyi bozar [79].

FOXO3 proteini, bir FOXO transkripsiyon faktörüdür ve forkhead ailesinin bir üyesidir. FOXO3, ya Bcl-2 ailesi proteinlerinin çoklu proapoptotik üyelerinin ekspresyonunu indükleyerek ya da Fas ligandı ve tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) gibi ölüm reseptörü ligandlarının ekspresyonunu uyararak apoptoz sinyalini destekler. FOXO3 fosforile edilir ve AKT'ye bağımlı bir mekanizma yoluyla çekirdekten dışarı taşınır. AKT'nin aşırı ekspresyonu ayrıca FOXO3 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu da inhibe eder [80].

2.2.5. Hücre Proliferasyonunda PI3K/AKT/mTOR Yolu

Aktive edilmiş AKT/mTOR, hücre proliferasyonunu düzenleyen önemli anahtar unsur olarak kabul edilir. Rapamisin gibi kimyasal ajanlar veya besin açlığı gibi çeşitli mTOR inhibitörleri, G1 fazında hücre döngüsü durmasını indükler. mTOR ayrıca hücre bölünmesini başlatmak için siklin D1'in sikline bağımlı kinaza (CDK) bağlanmasını da kolaylaştırır. Siklin D1'in aşırı ekspresyonu, G1'den S fazına hücre döngüsü geçişini indükler. Ayrıca mTOR, hücre büyümesi için gerekli olan proteinler, nükleotidler ve lipidler gibi biyolojik makromoleküllerin sentezinin kontrolünde anahtar bir rol oynar [81].

2.2.6. Kanser Metastazında PI3K/AKT/mTOR Yolu

Aktif AKT, mTORC1'in ve 4EBP1 ile p70S6K gibi aşağı akış hedeflerinin fosforilasyonunu indükler. 4EBP1'in aktivasyonu Snail, Slug ve Twist gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunu indükler. Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) belirteçlerinin (vimentin ve N-cadherin) yükselmesine ve epitelyal belirteçlerin (Ecadherin, ZO-1 ve claudin) ekspresyonunda azalmaya yol açar [82].

PI3K/AKT/mTOR yolu, F-aktin reorganizasyonunu düzenleyerek kanser hücresi göçünü ve istilasını yönetir. PI3K/AKT/mTOR yolu, F-aktin reorganizasyonunu düzenleyerek kanser hücresi göçünü yönetir. AKT, hücre göçünü düzenlemek için Ser507'yi fosforile ederek aktin ile ilişkili bir protein olan palladin'i aktive eder. PI3K/AKT/mTOR yolunun aracılık ettiği aktifleştirilmiş p70S6K, kanser hücresi hareketi sırasında aktin yeniden organizasyonunu kontrol eden Rac1 ve Cdc42'nin yukarı akış düzenleyicisi olarak işlev görür [91,92]. Aktive edilmiş p70S6K, kofilin ailesi proteinleri tarafından aktin depolimerizasyonunu önlemek için çapraz bağlı F-aktin ile doğrudan etkileşime girer [83].

2.2.7. Kanser Anjiyogenezinde PI3K/AKT/mTOR Yolu

Anjiyogenez kanserlerin ortak özelliklerinden biridir ve kanserin gelişmesi, ilerlemesi ve metastazı için çok önemlidir. Kanseri anjiyogenezinde önemli rolü olan hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 α 'nın (HIF-1 α) PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu tarafından düzenlenmektedir. AKT/mTOR, HIF-1 α transkripsiyon faktörünün transkripsiyonunu arttırmak için gerekli olan 4E-BP1 gibi aşağı akış sinyalini indükler [84].

2.3. Mikro RNA

MikroRNA'lar(miRNA veya miR), hedef mRNA'ların ekspresyonunu transkripsiyon sonrası düzenleyen, protein kodlamayan, kısa uzunlukta (~22 nükleotit) bir RNA sınıfıdır [85]. miRNA'lar ilk olarak 1993 yılında *Caenorhabditis elegans* nematodunda keşfedilmiştir [86]. miRNA'lar herhangi bir proteini kodlamasalar da, zigot gelişimi, hücre farklılaşması, metabolizma, hemopoez ve ayrıca karsinogenez dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerle bağlantılıdır [87]. miRNA'lar ya mRNA bozulmasını kontrol ederek ya da transkripsiyonel baskılama yoluyla, gen ekspresyonunun anahtar düzenleyicileri olarak rol oynamaktadır. Her miRNA'nın geniş bir hedef mRNA aralığına sahip olduğu varsayılır ve her mRNA, birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir [88].

2.3.1. miRNA Biyogenezi

Olgun miRNA'lar, çekirdekte DNA'dan üretilen pri-miRNA adı verilen öncüllerden türer. Pri-miRNA'lar hem kendi genlerinden hem de intronlardan üretilirler. Pri-mikroRNA'lar esas olarak polimeraz RNA II tarafından kopyalanır. Fakat, bazı pri-miRNA'lar polimeraz III tarafından kopyalanabilmektedir [89]. Pri-mikroRNA'lar daha sonra endonükleaz Drosha ve kofaktör DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) tarafından parçalanır. Yeni oluşturulan 80-100 nükleotidlik bir kök-ilmek molekülü pre-miRNA (prekürsör miRNA) olarak adlandırılır ve çekirdekten Ran-GTP bağımlı exportin 5 (Xpo5) ile sitoplazmaya taşınır [9]. Sitoplazmaya transfer edilen pre-miRNA Dicer ve partner protein ile (Drosophila R2D2, insan TRBP= TAR RNA-binding protein) kök ilmiğin yakınından kesilerek, çift sarmal yapılı miRNA:miRNA dubleks oluşturulur. Bu miRNA:miRNA dubleks hem olgun hem de tamamlayıcı miRNA parçasını içerir [90]. Son olarak miRNA:miRNA dubleks, RNA ile indüklenabilir susturucu kompleks (RISC) adı verilen protein kompleksine aktarılır. RISC yapısında bulunan argonuate (AGO2) proteinler tarafından kılavuz görevini üstlenecek olgun miRNA seçilir. Diğer tamamlayıcı zincir ise parçalanır [91]. RISC ve olgun miRNA, birlikte miRISC olarak adlandırılan bir yapı oluşturur. miRISC yapısındaki olgun miRNA hedef mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgesinde (3' UTR) bağlanır. miRNA-hedef mRNA bağlanma derecesine göre ya translasyon baskılanır ya da mRNA parçalanır [92].

Spesifik bir miRNA, yüzlerce hedef mRNA'yı aynı anda düzenleyebilir, ancak düzenleme derecesi %30-50'dir. Çok sayıda düzenleyici yolun, miRNA'ların biyogenezini stabilitesini ve susturma aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir. Bu süreçlerin düzensizliği, kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalığın patogenezinde yer almaktadır. miRNA biyogenezinin ilk aşaması olan pri-miRNA'nın transkripsiyonu birçok kanserde düzensizdir. miRNA genlerinin çoğu kanserde silinen, değiştiren veya kırılgen genomik bölgelerde bulunmaktadır [93]. Bu genomik değişiklikler, pri-miRNA transkripsiyonunu ve miRNA ekspresyonunu değiştirir. miRNA ekspresyonundaki bu değişiklik kanser başlangıcını ve ilerlemesini destekleyebilen aşağı akış hedef mRNA'ların anormal ekspresyonuna yol açar. Epigenetik değişiklik, miRNA ekspresyonunun düzensizliğini yönlendiren kanser patogenezinin ortak özelliğidir [94].

Pre-miRNA oluşumunda yer alan endonükleaz Drosha'nın artan ifadesi, miRNA ekspresyon profilini değiştirir ve hücre çoğalmasını, göçünü ve istilasını teşvik eder, bu da kanserin ilerlemesine katkıda bulunur [95]. Drosha skuamöz hücreli servikal karsinom, özofagus kanseri, bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom, düz kas tümörleri, mide kanseri, seröz yumurtalık kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yukarı regüle edilirken; mesane kanseri, yumurtalık kanseri, endometrial kanser, nazofarenks karsinomu, meme kanseri, safra kesesi adenokarsinomu, nöroblastom ve deri melanomunda aşağı regüle

edilmektedir [96]. Pre-miRNA oluşumunda droshanın kofaktörü olarak görev yapan DGCR8 ekspresyonu da kanserlerde düzensizdir. DGCR8 geninde meydana gelen mutasyon hücrel transformasyonu ve tümör büyümesini teşvik eder [97].

Çekirdekte işleme tabi tutulan pre-miRNA'ların tekrar işlenmek üzere çekirdek dışına aktarımına XPO5 ve onun kofaktörü RanGTP aracılık etmektedir. XPO5 mutasyonları, pre-miRNA'nın sitoplazmaya transferini bozar ve çekirdekte pre-miRNA'ların birikmesine neden olarak; miRNA biyogenezinde kusurlara yol açar. Xpo5 proteini, hücre döngüsü girişi sırasında PI3K'ya bağlı bir transkripsiyon sonrası mekanizma tarafından hızla indüklenir ve çoğalan hücrelerde olgun miRNA'larda genel bir artışa yol açar. Fakat bunun altında yatan mekanizma tanımlanmamıştır [98]. Xpo5'teki somatik ve germline heterozigot mutasyonlar, mikrouydu kararsızlığına (MSI) olan mide, endometrial ve kolon tümörlerinde meydana gelir [99].

Çekirdekten Xpo5 yoluyla ihraç edilen pre-miRNA'lar, Dicer ve kofaktörü TRBP tarafından sitoplazmada ikincil işleme tabi tutulur ve sonunda ~22 nükleotidlik olgun miRNA'ların oluşumuna yol açar. Dicer genindeki mutasyonlar protein seviyesinde veya işleme aktivitesinde bir azalma sonucu anormal miRNA ekspresyonuna neden olur ve kanser patogeneze katkıda bulur [100]. Drosha'ninkine benzer şekilde, kanser türüne bağlı olarak dicer ekspresyonu da kanser türüne bağlı olarak artabilir veya azalabilir. Dicer düz kas tümörleri, mide kanseri, seröz yumurtalık kanseri, prostat kanseri, ağız kanseri, kolorektal kanser, akciğer adenokarsinomunun öncü lezyonları ve deri melanomunda yukarı regüle edilirken; mesane kanseri, bazal hücreli karsinom, yumurtalık kanseri, endometrial kanser, nazofarenks karsinomu, nöroblastom, meme kanseri, safra kesesi adenokarsinomu, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, hepatosellüler kanser ve kronik lenfositik lösemide aşağı regüle edilmektedir [96]. Dicer'in partner proteini TRBP genindeki mutasyonlar, mikro uydu kararsızlığına (MSI) sahip sporadik ve kalıtsal karsinomda bulunur. Bu mutasyonlar, azalmış TRBP ve dicer ekspresyonunun yanı sıra pre-miRNA'ların hatalı işlenmesine neden olur [101].

AGO proteinleri, miRNA aracılı gen susturmanın kritik aşağı akış efektörleridir. İnsanlarda dört AGO proteini (AGO1-4) vardır. Mükemmel eşleştirilmiş siRNA veya miRNA dupleksleri, katalitik olarak aktif AGO2 tarafından bölünürken, AGO1, AGO3 ve AGO4, katalitik olarak aktif değildir ve RNA'ları parçalayamaz. AGO proteinlerine bağlanma, olgun miRNA'ları, bazal koşullar altında uzun süre stabilize eder. Hücrede AGO2 yokluğunda miRNA'lar kararsızdır, yarı ömürleri oldukça kısadır [102]. AGO proteinlerinin seviyesindeki patolojik bir değişiklik, miRNA stabilitesinde ve mRNA susturmada büyük bozulmalara neden olabilir. AGO1 ve AGO2 aktinik keratoz, skuamöz hücre karsinoması, bazal hücreli karsinom[103] ve seröz yumurtalık kanserinde [104] yukarı regüle edilir.

2.3.2. Kanserde miRNA'lar

miRNA'lar, kanserin başlaması, ilerlemesi ve metastaz gibi temel hücresel süreçlerde ana düzenleyiciler olarak karşımıza çıkmaktadır. Aşırı eksprese edilen miRNA'lar; tümör baskılayıcı, hücre farklılaşmasını yada apoptozu kontrol eden genleri aşağı regüle ederek; onkogenler olarak işlev görebilirken, aşağı regüle edilmiş miRNA'lar; hücre farklılaşmasını veya apoptoz kontrol eden onkogenleri negatif olarak düzenleyerek tümör baskılayıcı genler olarak işlev görür. miRNA genlerindeki genetik değişiklikler, miRNA transkripsiyonunda yer alan anahtar transkripsiyon faktörlerinin düzensizliği, epigenetik değişiklikler ve miRNA biyogenezindeki kusurlar anormal miRNA ekspresyonuna neden olarak tümör başlangıcı ve ilerlemesi için bir veya birkaç kanser ile ilgili hücresel olayda rol oynayabilmektedir [105].

a) Kanserde Hücre Proliferasyonunun Düzenlenmesi

Hücre proliferasyonu kanserin en önemli özelliğidir ve anormallliği tümörigenezin önde gelen nedenidir. Kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinde veya inhibe edildiğinde bir dizi miRNA'nın hücre döngüsü düzenleyicilerine müdahale ettiği bildirilmiştir. Bu miRNA'ların çoğu, PTEN, Myc, Ras ve ABL gibi kritik düzenleyicilere etki ederek hücre proliferasyon yollarını modüle eder [106]. miR-21 ve miR-17-92 kümesi PTEN ekspresyonunu inhibe ederek; hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu teşvik edebilir [107,108]. Bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F proteinleri, hücre döngüsüne bağlı bir şekilde hücre çoğalmasının kritik düzenleyicileridir. E2F üyesi E2F1, hücre döngüsünün G1'den S'ye geçiş sırasında hedef gen transkripsiyonunu indükler. miR-17-92; c-Myc tarafından aktive edilen E2F1'i inhibe ederek bir fren görevi görebilir [109]. Bir tümör baskılayıcı olan p27(Kip1), hücre döngüsünde G1'den S'ye geçişi önlemek için CDK2-siklin E'ye bağlanır. miR-221 ve miR-222, kanser hücrelerinde proliferatif bir işlev yürütmek için p27'nin (Kip1) 3' UTR'sindeki hedef bölgelere doğrudan bağlanarak etki eder [110].

b) Kanserde Apoptozun Düzenlenmesi

Normal hücrelerin aksine kanser hücreleri, çevresel stres koşulları altında hücrenin hayatta kalmasını sağlamak için pro- ve anti-apoptotik faktörler arasındaki dengeyi bozabilir. miRNA'lar, doğrudan anti-apoptotik genleri hedefleyerek tümör oluşumuna katılabilir. miR-15 ve miR-16 gibi pro-apoptotik miRNA'lar, apoptozu teşvik ederek tümör gelişimini antagonize etmek için Bcl-2'yi hedefleyebilir ve inhibe edebilir [111]. miR-29, miyeloid hücre lösemi-1 (Mcl-1) protein ekspresyonunu düzenleyerek apoptozu indükleyebilir [112]. miR-29 aşağı regülasyonu ile Mcl-1 protein ekspresyonu artar ve kanser hücresi apoptozdan kaçabilir. miR-34a, miR-34b ve miR-34c gibi miR-34 aile üyeleri, çeşitli insan kanserlerinde aşağı regüle edilir.

miR-34 fonksiyonunun azalması, p53 aracılı hücre ölümünü azaltırken, aşırı eksprese edilen miR-34'ler, hücre gelişimini destekleyen Bcl-2, CDK4 ve hepatosit büyüme faktörü reseptörü (C-Met) gibi birkaç hedef geni doğrudan baskılayarak apoptoza veya hücrel yaşlanmaya yol açar [113]. miR-17-92 kümesi, tümör baskılayıcı PTEN'i ve proapoptotik protein Bim'i negatif olarak düzenleyerek apoptozu da inhibe edebilir [108]. miR-21'in yukarı regülasyonu hücre ölümünü azaltır ve kanser hücrelerine önemli bir hayatta kalma avantajı sağlayabilir [114].

c) Kanser Hücrelerinin Çoğalma Potansiyelinin Düzenlenmesi

İnsan hücreleri normalde 50-70 bölünme ile sınırlı sonlu bir replikasyon potansiyeline sahiptir. Fakat ölümsüzleşme, bir kanser hücresinin oluşumu için önemli bir ön koşuldur. Kanser hücreleri, telomerazı yukarı regüle ederek veya alternatif olarak telomerleri uzatarak telomerlerin korunması yoluyla ölümsüzleştirme özelliğini kazanır. miR-290 kümesi Dicer1 eksikliği olan hücrelerde aşağı regüle edilir ve Rbl2'yi (retinoblastoma benzeri 2 protein) susturur, böylece DNA metiltransferaz (Dnmt) ifadesini kontrol eder. Yani, miR-290'ın doğrudan Rbl2'ye bağlı Dnmt ekspresyonunu düzenleyerek; dolaylı olarak telomer uzunluğunu etkilemektedir [115]. Tümör baskılayıcı p16^{INK4a}'nın ifadesi, replikatif yaşlanma sırasında artar. Replikatif yaşlanma sırasında miR-24'ün aşağı regüle edildiğini ve miR-24'ün servikal karsinom hücrelerinde p16^{INK4a} translasyonunun baskılayabildiğini göstermiştir [116].

d) Kanserde Anjiyogenezin Düzenlenmesi

Anjiyogenez, tümör büyümesi ve metastazında gıda ve oksijen ihtiyacını karşılamak için yeni kan damarları geliştirme sürecidir. Tümör dokuları, normal dokulardan önemli ölçüde daha düşük oksijen konsantrasyonuna sahiptir. Hipoksi, kanser hücrelerinin gelişmesine ve korunmasına izin verir. Hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF), miRNA'lar da dahil olmak üzere bir dizi genin ekspresyonunu etkiler. Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), endotel hücrelerinin reseptörlerine bağlandıktan sonra yeni damarlar oluşturmaya yönlendiren önemli bir anjiyojenik faktördür [117]. miR-210, hipoksi sırasında en tutarlı ve anlamlı şekilde indüklenen miRNA'dır. Aşırı miR-210 ekspresyonunun kapiler benzeri yapıların oluşumunu ve VEGF'ye bağlı hücre göçünü uyarmaktadır [118]. miR-221 ve miR-222, kök hücre faktör reseptörü c-Kit'i hedefleyerek ve endotelial nitrik oksit sentaz ekspresyonunu dolaylı olarak düzenleyerek endotel hücre göçünü, proliferasyonunu ve anjiyogenezi in vitro olarak inhibe eder [119]. Endotel hücresine özgü miR-126'nın VEGF veya temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi anjiyojenik büyüme faktörlerine yanıt olarak anjiyogenezi desteklediği ve önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [120].

e) Kanserde Bağışıklık Tepkilerinin Düzenlenmesi

Kanser hücreleri immün saldırıdan kaçma yeteneğine sahiptir ve bazı miRNA'lar kanserde bu bağışıklık düzenlemesine katılabilmektedir. miR-155, normal bağışıklık fonksiyonunda yer alan sitokinler (IL-4), kemokinler (CCL5) ve transkripsiyon faktörleri (c-Maf) gibi bazı genleri düzenleyebilir. miR-155 insan B hücreli lenfomalarında yüksek oranda eksprese edilmektedir [121]. miR-17-5p, miR-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373 ve miR-520c'nin aşırı ekspresyonu, aktive edici reseptör NKG2D tarafından tanınan stres kaynaklı ligandlar olan MICA ve MICB ekspresyonunu azaltabilir. Kanser hücreleri MICA ve MICB proteinlerinin aşağı regülasyonu yoluyla immün tanımadan kaçınırlar [122].

f) Tümör İnvazyonu ve Metastazının Düzenlenmesi

miRNA'ların epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve metastazda önemli rolü bulunmaktadır. Örneğin miR-155 hücre polarite ve stabilitesinin önemli bir düzenleyicisi olan RhoA GTPaz'ı hedefleyerek EMT'yi desteklemektedir. miR-155'in yıkılması, TGF- β kaynaklı EMT'yi, ayrıca hücre göçünü ve istilasını bastırır [123]. miR-200 ailesi ve miR-205 E-kadherin transkripsiyonel baskılayıcıları ZEB1 ve ZEB2'nin ekspresyonunu inhibe ederek EMT'yi etkilediği gösterilmiştir [124].

TWIST ve SNAIL belirli miRNA'ların ekspresyonunu düzenleyerek; epitelyal hareketliliği, invazyon ve metastazı destekleyen iki anahtar transkripsiyon faktörüdür. miR-10b, metastatik meme kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir ve TWIST'in miR-10b geninin varsayılan promotörüne doğrudan bağlanmasıyla hücre göçünü ve invazyonu pozitif olarak düzenler [125].

Metastazın düzenlenmesinde rol oynayan diğer önemli miRNA'lar arasında miR-9 ve miR-212 bulunur. miR-9 ifadesi, miR-9-3 lokusuna bağlanan c-Myc ve n-Myc tarafından aktive edilir. miR-9'un meme kanseri hücrelerinde E-kadherin ekspresyonunu doğrudan 3' UTR'sine bağlanarak azalttığını belirlenmiştir [126]. miR-212, hem promotör hipermetilasyonu hem de heterozigotluk kaybı nedeniyle kolorektal kanserde önemli ölçüde aşağı regüle edilir. Manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) mRNA'sı miR212'nin doğrudan hedefidir. miR-212'nin aşırı ekspresyonu, in vitro olarak kolorektal kanser hücre göçünü, invazyonunu ve in vivo olarak intrahepatik ve pulmoner metastaz oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir [127].

2.3.3. Kanserde Biyobelirteç Olarak miRNA'lar

Kanserde miRNA ekspresyonunun dokuya özgü deregülasyonu kanserin teşhisi, prognozu ve tedaviye yanıtın biyobelirteçleri olarak kullanılabilirliğini halen araştırılrsa da pratikte rutin olarak kullanılmamaktadır. miRNA'lar kan [128], idrar [129] ve tükürük [130]

gibi diğer vücut sıvılarında, ayrıca formalinle fikse edilmiş parafin doku bloklarında[131] da bulunmaktadır. miRNA'ların kanser biyobelirteçleri olarak tanısal ve prognostik potansiyeli, temel olarak yüksek stabilitelerine ve depolama işlemine karşı dirençlerine dayanır. Serum miRNA'larının kaynama, çok düşük veya yüksek pH seviyeleri, uzun süreli saklama ve dondurma-çözdürme döngüsü gibi normalde çoğu RNA'yı bozacak şiddetli koşullara maruz kaldıktan sonra bile stabil kaldığı gösterilmiştir [132]. Bu stabilite, miRNA'ların hücre dışında eksozomlar veya mikroveziküller, apoptotik cisimler, lipoproteinler (örneğin HDL) ve proteinlerle (RISC yapısında bulunan Ago-2 gibi) taşınmasıyla açıklanabilir [133].

miRNA ekspresyon seviyeleri mikroarray, kantitatif RT-PCR ve yeni nesil dizileme teknikleriyle belirlenebilmektedir. miRNA'ların ekspresyon profillerini saptamak için mikroarray tabanlı teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır [134]. Mikroarray yönteminin avantajı, vücut sıvılarında miRNA'ların genom çapında ekspresyon profillerini değerlendirme ve kanserde tanı amaçlı çok sayıda aday biyobelirteç sağlama yeteneğidir. Ancak bu yöntemin dezavantajı yüksek konsantrasyonda toplam RNA gerektirmesi ve ön amplifikasyon adımı gerektirmesi nedeniyle miRNA'ların orijinal konsantrasyonunu değiştirme riskidir [135]. miRNA tespitinde yaygın olarak kullanılan yöntem qRT-PCR 'dir. Bu yöntem hem doku örneklerinden hem de vücut sıvısı örneklerinden miRNA'ları saptamak için kullanılabilir [136]. Bu yöntem U6, let-7a, miR-16 ve 5S gibi uygun referans kontrol geni kullanmayı gerektirir. Ancak bu referans kontrollerin kararlı veya güvenilir olarak kullanılması için standart bir normalizasyon protokolünün tanımlanması gerekmektedir [137]. Yeni nesil dizileme tekniği miRNA'ları tespit etmek için başka bir teknolojidir. Bu yöntem, büyük miktarlarda başlangıç materyali gerektirmesine rağmen hem bilinen hem de bilinmeyen yeni miRNA'ları tespit edebilme avantajına sahiptir [138]. Bir çalışmada miRNA tespiti için dedektör olarak floresan mikroskobu kullanılan, örnek amplifikasyonu gerektirmeyen, spesifik ve oldukça hassas bir yöntem önerilmiştir. Hedef miRNA'ları yakalamak için tamamlayıcı dizi ve prob olarak kendi kendine birleşen bir protein nanofibrili kullanan bu yöntem, çok düşük RNA konsantrasyonlarını tespit edebilmektedir [139]. Elektrokimyasal genosensör aracılığıyla miRNA tespiti yapan bir yöntem; PCR ve etiketleme reaksiyonuna ihtiyaç duymadan miRNA'ları doğrudan tespit edebilmesi açısından dikkat çekicidir. Test basit, çok hızlı ve aşırı duyarlıdır. 0,1 pmol tespit limiti vardır [140]. Serum ve diğer biyolojik numunelerde rutin bir miRNA tespiti için özellikle uygulanabilir görünmesine rağmen pratik uygulamalarda henüz yerini alamamıştır. Dijital renk kodlu barkod teknolojisini kullanan NanoString nCounter yöntemi, amplifikasyon olmadan molekül ekspresyon seviyelerinin doğrudan ölçümü ve formalinle sabitlenmiş parafine gömülü örneklerle bile uygulanabilirliği gibi avantajları nedeniyle mRNA veya miRNA diferansiyel ekspresyon çalışmaları için giderek daha fazla kullanılmaktadır [141].

Birçok kanserde tanı, prognoz ve tedavi takibi için miRNA'lar biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir. Biyobelirteç olarak kullanılan miRNA'lar Tablo 2.7.'de örneklenmiştir.

Tablo 2.7. Kanserlerde tanı, prognoz ve tedavi takibi için kullanılabilecek potansiyel miRNA biyobelirteçleri örnekleri [142,143]

Kanser Tipi	miRNA	Düzensizlik	Örnek Tipi	Ölçüm Metodu
Tanı İçin				
Kolorektal kanser	miR-103a-3p, miR-127-3p, miR-151a-5p, miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-18a-5p, miR-18b-5p	Aşağı	Plazma	qRT-PCR
Serviks kanseri	miR-25/92a miR-22/29a	Yukarı	Servikal Sürüntü	Northern Blot, qRT-PCR
Gastrik kanser	miR-491-5p	Aşağı	Soku ve Serum	qRT-PCR
İnvaziv meme kanseri	Eksozomal miR-223-3p	Yukarı	Plazma Eksozomları	TaqMan miR array
Glioma	miR-21, miR-222 ve miR-124-3p	Yukarı	Serum Eksozomları	qRT-PCR
Meme kanseri	miR-21	Yukarı	Kan	Elektrokimyasal, Nano-genosensor
Akciğer kanseri	miR-33a-5p ve miR-128-3p	Aşağı	Doku ve Kan	qRT-PCR
Prostat kanseri	miR-214	Aşağı	Hücre Hattı	qRT-PCR
Hepatosellüler kanser	miR-221	Yukarı	Hücre Hattı, Doku ve Serum	qRT-PCR
Kötü prognoz için				
Özofagus skuamöz hücreli karsinom	miR-1	Aşağı	Doku	ISH
İleri servikal kanser	miR-944	Yukarı	Hücre hattı ve FFPE doku	RT-qPCR
Gastrik kanser	miR-155	Yukarı	Doku	qRT-PCR
Yumurtalık kanseri	miR-135a-3p	Aşağı	Serum	miRNA array ve qRT-PCR
Tedavi Takibi İçin				
Baş ve Boyun Kanseri	miR-425-5p	Yukarı	Plazma	qRT-PCR
	miR-93-5p	Aşağı		
Meme Kanseri	miR-155, miR-21	Yukarı	Plazma	qRT-PCR

2.3.4. Kanser Tedavisinde miRNA'lar

Kanserde, düzensiz miRNA ekspresyonu görülmektedir. Bu düzensizliklerin giderilmesi yoluyla miRNA bazlı gen tedavisi kanser tedavisi için yeni bir strateji haline gelmektedir. miRNA'ların kanserdeki biyolojik rolleri, tümör baskılayıcı veya onkojenik olabilir. Onkogenleri hedef alan tümör baskılayıcı miRNA'lar kanserde aşağı regüle olma eğilimindedir. Buna karşılık, tümör baskılayıcı genleri düzenleyen onkojenik miRNA'lar kanserde aşırı eksprese edilir. miRNA bazlı gen tedavi stratejisi aşırı eksprese edilen oncomiR'lerin susturulmasını veya aşağı regüle edilmiş tümör baskılayıcı miRNA'ların değiştirilmesini içerir [105]. miRNA aracılı gen düzenlemesi, hedef mRNA'nın 3'-çevrilmemiş bölgesi ile miRNA'nın tohum dizisi arasında tam olmayan bir tamamlayıcı bağlanmaya esasına dayanır. Böylece, bu kısmi tamamlayıcı baz eşleşmesi, bir miRNA'nın birden fazla hedeflenen genin ekspresyonunu eşzamanlı olarak düzenlemesine izin verir [144].

OncomiR'lerin susturulması tümör baskılayıcı genlerin normal ekspresyonunu ve işlevini geri kazanmaya yardımcı olmak için uygulanır. OncomiR'ler, sentetik antisens oligonükleotitler (ASO), kilitli nükleik asit (LNA), miRNA antagomirleri ve miRNA süngerleri uygulanarak inhibe edilebilir. ASO'lar, yaklaşık 17-22 antisens anti-miR oligonükleotitleri olan ve ilgili bir miRNA'yı tamamlayıcı olacak şekilde tasarlanmış tek sarmallı, kimyasal olarak modifiye edilmiş antisens oligonükleotitlerdir. Bu antisens oligonükleotidi, tamamlayıcı olgun miRNA'ya bağlanmak üzere tasarlanmıştır ve bu miRNA'nın spesifik mRNA hedefleriyle etkileşimini inhibe ederek normal translasyona izin verir [145]. LNA, modifiye edilmiş bir ASO'nun bir örneğidir. LNA'lar miRNA hedef molekülleri ile daha yüksek termal stabilite ve afinite gösterir, daha yüksek suda çözünürlüğe sahiptir ve in vivo dağıtım için metabolik stabiliteyi arttırmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında glioblastomda LNA ile modifiye edilmiş antisens oligonükleotitlerin, aşırı eksprese edilen miR-21'i susturma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir [146]. miRNA süngerleri, mRNA'ların 3' çevrilmemiş bölgesini taklit eden ve hedeflenecek spesifik miRNA'yı tamamlayıcı miRNA bağlama bölgeleri taşıyan kısa transkriptlerdir. miRNA süngerlerinin üzerindeki bağlanma bölgeleri genellikle aynı tohum bölgesini paylaşan belirli bir miRNA veya miRNA ailesi üyelerini hedeflemek için tasarlanmış aynı dizinin tandem tekrarlarıdır [147]. İn vitro olarak miR-9 [148], miR-19, miR-155 [149], miR-221 ve miR-222 [150] onkojenik miRNA'ları inhibe etmek için miRNA süngerlerini kullanılmış ve başarıya ulaşmıştır. miRNA aracılı terapi için ASO bazlı ajanlar aynı zamanda hedef koruyucular olarak da kullanılabilir. mRNA'ların 3'-çevrilmemiş bölgesi ile etkileşerek onkojenik miRNA'ların hedeflerine bağlanmasını önlerler, böylece daha sonra bastırılmış olan genlerin normal aktivitesini yeniden etkinleştirirler. Meme kanseri hücrelerinde miR-196a2 tümör baskılayıcı TP63'ü inhibe etmektedir. MiR-196a2'ye karşılık gelen miRNA maskeleme

oligonükleotidi ile tedavi uygulandığında kanser proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [151]. Son zamanlarda küçük RNA fermuarları adında, hedef miRNA'nın farklı bölgeleri ile etkileşerek; dubleks oluşturup miRNA fonksiyonunu inhibe etmek için özel oligonükleotidler tasarlanmıştır. Küçük RNA fermuarları Hedef miRNA'nın molekülünün 5'-yarı dizisinde ve diğer tarafta 3'-yarı dizisinde başka bir bölgede tamamlayıcı etkileşim yoluyla bağlanan özel olarak tasarlanmış özel oligonükleotidlerdir. miRNA'nın fonksiyonlarını etkin bir şekilde bloke etmek için hedef miRNA moleküllerini uçtan uca birbirine bağlayan stabil bir dubleks yapı oluşturulur. Spesifik olarak iki onkojenik miRNA'yı (miR-17 ve miR-221) hedefleyen küçük RNA fermuarının, hedeflenen miRNA'ların ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı, kanser hücrelerini doksorubisin tedavisine duyarlı hale getirdiği ve kanser hücresi göçünü engellediği gösterilmiştir [152]. Onkojenik miRNA'ları inhibe etmek için ayrıca kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ile ilişkili nükleaz 9 (Cas9) sistemi, spesifik onkojenik miRNA öncüllerinin Drosha/Dicer işleme bölgesine mutasyonlar eklemek ve böylece olgun miRNA'ların biyogenezini ve ekspresyonunu inhibe etmek için uygulanmıştır [153]. Onkojenik miR-17, miR-21, miR-141 ve miR-3188'in spesifik CRISPR/Cas9 sistemleri tarafından inhibisyonunun kanser hücresi proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği bildirilmiştir [154,155].

Tümör hücrelerinde aşağı regüle edilen tümör baskılayıcı miRNA'ları geri yükleyerek apoptozu indüklemek veya tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmek için miRNA restorasyon tedavisi kullanılmaktadır. miRNA restorasyonu olgun miRNA duplekslerini taklit eden kimyasal olarak sentezlenen çift sarmallı RNA molekülleri olan sentetik miRNA taklitlerinin doğrudan transfeksiyonu ile sağlanabilir [156]. miRNA restorasyonunda kullanılan tek bir miRNA mimik (taklitleri) birden fazla yolu hedeflemek üzere tasarlanabilmesi tedavide avantaj sağlamaktadır. Çeşitli çalışmalar, miRNA restorasyon tedavisinin in vitro ve in vivo etkinliğini göstermiştir. Örneğin, prostat kanseri hücre hatlarında miR-15a ve miR-16 mimiklerinin eklenmesi, önemli apoptoza neden olmuş ve proliferasyonu inhibe etmiştir [157]. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde Let-7'nin mimik uygulanmasıyla K-ras mutant farelerde yapılan in vivo çalışma, hücre proliferasyonunu ve hücre döngüsü yollarını bloke ederek tümörlerin büyümesini verimli bir şekilde sınırlandırmıştır [158]. miRNA restorasyon tedavisi uygulamanın diğer bir yolu da tümör baskılayıcı miRNA'ların ekspresyonunu arttırmak için adenoviral, lentiviral ve retroviral vektörler gibi miRNA ekspresyon vektörlerini kullanmaktır. Hepatosellüler karsinom (HCC) hücrelerinde azalan miR-26a ekspresyonu, fare modelinde miR-26a taşıyan rekombinant adenovirüs kullanılarak, herhangi bir toksiteye neden olmadan kanser hücresi çoğalmasının inhibisyonu, apoptozun indüklenmesi ile sonuçlanmıştır [159].

miRNA'ların bazı özellikleri, miRNA bazlı tedavilerin gelişimini engellemektedir. miRNA'ların negatif yüklü ve hidrofilik olması hücre zarından penetrasyonlarını engeller [160]. miRNA'lar, kandaki RNaz aracılı bozunma nedeniyle stabil değildir. Viral ve viral olmayan vektörler, miRNA terapötiklerinin verilmesiyle ilişkili sınırlamaların üstesinden gelmek için geliştirilmiştir[161]. Viral vektörler yüksek transfer verimliliğine izin vermelerine karşın bir virüse miRNA terapötiklerinin yüklenmesi sınırlıdır ve virüs vücutta olumsuz bir bağışıklık tepkisini tetikleyebilir. miRNA'ların bu olumsuzlukların üzerinden gelerek hedefe iletilmesi için inorganik nanopartiküller [162], lipit nanovektörler [163], lipozomlar [164], dendrimerler [165] ve polipeksler [166] gibi çeşitli dağıtım sistemleri geliştirilmiştir.

10 miRNA bazlı ilaç klinik çalışmalara başlamış, fakat hiçbir Faz III'e geçememiş ve yarısı durdurulmuştur. Çeşitli kanser türlerine sahip hastalarda miR-34 ekspresyonunu eski haline getirmek için sentetik bir miR-34 mimikini (MRX34) kullanılan klinik deneyler, 2013 yılında Mirna Therapeutics Inc. tarafından başlatılmıştır. Ancak toksisite ve ters bağışıklık reaksiyonları daha fazla gelişmesini engellemiştir [167]. Bakteri aracılı transfer sistemi kullanan miR-16 yüklü nanohücrelerin güvenlik ve aktivitesine ilişkin insanda ilk kez yapılan Faz I araştırmasında plevral mezotelyomada (EnGeneIC Ltd.) umut vaadeden sonuçlar elde edilmiştir. Ancak miR-16 mimik alan hastalarda bazı toksisiteler rapor edilse de bu dezavantaj dozların optimize edilmesi ve organa özgü uygulama yollarının uygulanmasıyla giderilebilir [168]. miR-29 mimik (MRG-201; miRagen Therapeutics Inc.) kullanılan başka bir Faz II klinik deney keloidleri ve skar dokusu oluşumunu tedavi etmeyi amaçlasa da, miR-29 çeşitli kanserlerde (özofagus skuamöz hücreli karsinom, mide kanseri ve miyeloid lösemi dahil) kanıtlanmış bir tümör baskılayıcı olduğu için bir antitümör aracı olarak da test edilebilir [169].

2.3.5. PI3K/AKT/mTOR Yolağına Etki Eden miRNA'lar

PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliği birçok kanser tipinin patogenezinde rol oynamaktadır. Sistemik insülin ve endometrial insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'in yüksek seviyelerinin endometrial kanser prognozunu kötüleştirdiği gösterilmiştir [170]. İnsülin ve IGF-1'in reseptörleriyle etkileşimleri sonucu PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktive olarak; hücre proliferasyonuna sebep olduğu bilinmektedir [171]. İnsülin ve IGF-1 reseptörlerinin aşırı ekspresyonunda PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı aktivasyonu yoluyla endometrial hiperplazi ve tip-1 endometrial kanser gelişimine yol açtığı bildirilmiştir [172]. Bir çok kanser türünde PTEN'in PI3K/AKT/mTOR yolunu negatif düzenleyerek; tümör baskılayıcı bir protein olduğu gösterilmiştir. PTEN ekspresyonun zayıflaması; PI3K/AKT/mTOR yolunun aktivasyonuna yol açan, bunun sonucu olarak endometrial tümör oluşumu ve invaziv büyümesini sağlayan kilit bir mekanizmadır [173]. PTEN kaybı veya PI3K/AKT/mTOR yolundaki diğer düzensizlikler

Enhancer Zeste Homolog2 (EZH2), B lenfoma Mo-MLV yerleştirme bölgesi 1 (BMI-1), Slug(SNAI2)/Snail(SNAI1), Twist1 gibi epitel-mezenkimal geçiş (EMT), invazyon ve metastaz özelliklerinin artabileceğini göstermektedir [174].

MikroRNA'lar insan tümörlerinde PI3K/AKT/mTOR yolundaki bir çok anahtar bileşeni hedeflemektedir. Karaciğer kanserinde miR-21, miR-261a, miR-217, prostat kanserinde miR-26a, miR-92a, nazofarenks kanserinde miR-205 ve miR-144, osteosarkom tümöründe miR-17 PTEN kaybına neden olur [173–175]. Benzer şekilde akciğer ve karaciğer kanserlerinde miR-221 ve miR-222 PTEN'i hedefleyerek; AKT ekspresyonunu artırır [176]. MiR-182-5p ekspresyonu, meme kanserinde kötü prognozla bağlantılı olarak artmıştır. MiR-182-5p ekspresyonun anti-miR uygulayarak azaltılmasıyla, hücre proliferasyonu ve PTEN ekspresyonunu artırmaktadır [177]. Multipl miyelom hücre hattı modellerinde ve in vivo çalışmalar, miR-19b ve miR-20a'nın hücre apoptozunun inhibisyonu, hücre proliferasyonunda artış ve PTEN ekspresyonunun baskılanması yoluyla tümörjenisitenin indüklenmesindeki etkisini göstermiştir [178]. Osteosarkom hücrelerinde miR-19a-3p'nin yukarı regülasyonu, kemoterapötik ajan cisplatine direnç ile ilişkilendirilmiştir. Bu etki, PTEN ekspresyonunun baskılanması yoluyla meydana gelmektedir [179].

İn vivo ve in vitro çalışmalar kolorektal kanserde miR-375'in tümör süpresör rol oynayarak; PIK3CA'nın ekspresyonunun aşağı regülasyonu yoluyla hücre büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir [180]. PI3K'ün p85 alt birimini etkileyen miR-155 ve miR-126 aşırı ekspresyonu tümör hücrelerinin büyümesini baskılar. Akciğer kanseri hücrelerinde regüle edilen MiR-1, PI3KCA'yı hedefler ve p-AKT seviyelerini düşürerek; kanser hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu baskılamaktadır [181]. Benzer şekilde karaciğer kanser hücrelerinde miR-7 PI3KCD'ı baskılar. miR-125b tiroid kanserinde PI3KCD'ı hedefleyerek; PI3K, p-AKT ve p-mTOR ekspresyonlarını azaltmaktadır [182]. Tiroid karsinomunda miR-126, PIK3R2 genini hedefleyerek; p85 β protein translasyonunu azaltır ve AKT kinaz aktivitesini düşürür [183]. Kolorektal kanserde miR-520 ve 525a'nın, PIK3CA'yı hedeflediği bildirilmiştir [184]. Pankreas kanserinde miR-142-5p [185], retinoblastomda miR-363-3p [186], epitelyal overian kanserde miR-337-3p [187], meme kanserinde miR-10a-5p [188], yumurtalık kanserinde miR-381[189], mide [190] ve meme [191] kanserinde miR-152 PIK3CA'yı hedefler. miR-17-5p ekspresyon seviyesi laringeal skuamöz hücreli karsinom (LSCC) dokularında ve hücre hatlarında yukarı regüle edilmektedir. LSCC hücrelerinde miR-17-5p'nin normal seviyelere düşmesi, hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltarak; in vitro ve in vivo olarak hücre apoptozunu desteklemiştir. miR-17-5p düzeyinin anti-miR uygulamasıyla azaltılması, AKT fosforilasyonunu bastırmış, ancak PTEN ekspresyonunu etkilememiştir. miR-17-5p'nin

PIK3R1 ifadesi üzerindeki etkisini saptamak için yapılan lusiferaz raportör testine göre miR-17-5p, PIK3R1 ekspresyonunu pozitif olarak düzenlemiştir [192]. Benzer şekilde oral skuamöz hücreli karsinomda miR-221'in [193], küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde miR-486-5p'nin [194], endometrial kanserde miR-495'in [195] doğrudan hedefi PIK3R1'tir ve böylece PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına etki etmektedir. Meme kanseri dokularında miR-204-5p [196], mide kanserinde ise miR-125b-2 [197] aşağı regüle edilmektedir ve her iki miRNA da PI3K/AKT yolunun önemli bir üyesi olan PI3K β 'yi kodlayan PIK3CB mRNA'sına bağlanır. Tiroid kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde miR-125b aşağı regüle edilir ve tümör baskılayıcı olarak tanımlanır. MiR-125b'nin PIK3CD ekspresyonunu hedefleyerek hücre göçünü ve istilasını baskılamaktadır [198]. Diffüz büyük B hücreli lenfomada miR-224 ve T hücreli akut lenfoblastik lösemide miR-26b PIK3CD'yi hedefleyerek; PI3K/AKT yolunu düzenler [199]. Hepatoselüler karsinomda miR-513b-5p [200], miR-601 [201] ve miR-1287 [202], osteosarkomda miR-29c-3p [203], PIK3R3'ü hedefleyerek; hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu baskılamaktadır.

AKT miR-143'ün doğrudan hedefidir ve mesane kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe edilmesine aracılık eder [204]. Bazı mikroRNA'lar AKT'yi etkileyen başka elemanları etkileyerek AKT düzeyini regüle eder. Örneğin miR-133a EGFR'yi hedefleyerek; meme kanseri hücrelerinde p-AKT'yi baskılayıp; proliferasyonu negatif yönde regüle eder [205]. Protein kinaz B'nin izoformu AKT3 miR-320a'nın doğrudan hedefidir. miR-320a küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) tümör baskılayıcı bir role sahiptir. NSCLC'de aşağı regüle edilmiş miR-320a, AKT3 ile ilişkili PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu proteinlerin ekspresyonlarını arttırmaktadır [206]. Özofagus skuamöz hücreli karsinom dokularında ve hücrelerinde miR-145 aşağı, AKT3 yukarı regüle edilir. Lusiferaz raportör tahlili, miR-145'in AKT3'ün 3'-UTR'sine bağlanması nedeniyle negatif olarak düzenlediğini ortaya çıkarmıştır [207]. Benzer şekilde tiroid kanserinde miR-145 ekspresyonu normal ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde aşağı regüle edilir. miR-145 aşırı ekspresyonu PI3K/Akt yolunu inhibe eder ve doğrudan AKT3'ü hedef alır [208]. Prostat kanserinde miR-16-5p [209], wilms tümöründe miR-22-3p [210], papiller tiroid kanserinde miR-203 [211], pankreas karsinomunda miR-489 [212] aşağı, AKT3 ise yukarı regüle edilir. miRNA mimiklerle hücre hattında ilgili mikroRNA'lar yukarı regüle edildiğinde invazyonu, proliferasyonu ve migrasyonu baskılayarak; AKT3'ü aşağı regüle etmiş ve apoptozunu indüklemiştir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde miR-582-5p, AKT3 ekspresyonunu inhibe ederek hücre büyümesini ve tümör oluşumunu baskılar [213].

miR-7, miR-99a, miR-100, miR-101, miR-223 birçok tümör hücresinde mTOR'u düzenlemektedir. Hepatosellüler karsinomda (HCC) miR-7'nin bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmek, in vitro ve in vivo olarak PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu aracılığıyla tümör oluşumunu

inhibe etmedir. miR-7 PIK3CD, mTOR ve p70S6K'yı hedefleyerek, PI3K/Akt yolunu düzenler [214]. Çocukluk çağı adrenokortikal tümörlerinde (ACT) miR-99a ve miR-100 aşağı regüle edilir. mTOR ve raptor proteinlerinin kanser hücrelerinde inhibisyonu için miR-99a/miR-100 doğrudan hedeflerdir [215]. Büyük hücreli lenfomada miR-101 eksikliği mTOR yolu aktivasyonunun başlatılmasında ve/veya sürdürülmesinde rol oynamaktadır [216]. Hepatoselüler karsinomda(HCC) miR-223 tümör baskılayıcı olarak işlev görür. İn vitro çalışmalarda mTOR yolunu hedefleyerek HCC apoptozunu teşvik etmede kritik bir rol oynadığı görülmektedir [217]. Gliomada miR-153'ün aşırı ekspresyonu, mTORC2'yi hedefleyerek hücre büyümesinin inhibisyonuna ve apoptozun aktifleşmesine neden olabilir [218]. Osteosarkom dokularında miR-503[219], rahim ağzı kanserinde miR-218 [220], nazofarenks ve rahim ağzı kanserinde miR-155 [221], kolon kanserinde miR-451 [222] aşırı eksprese edilir ve bu mikroRNA'ların doğrudan hedefi mTOR kompleksi 2 (rictor)'dur. İlgili miRNA'ların aşırı ekspresyonu rictor seviyesini önemli ölçüde azaltmaktadır. Mide kanserinde miR-let-7a hedefi mTOR kompleksi 2 (Rictor)dır. Mide kanserinde miR-let-7a hedefi mTOR kompleksi 2 (Rictor)dır. miR-let-7a mide kanseri hücrelerinde Rictor ekspresyonunu inhibe ederek; hücresel otofaji düzenlemektedir [223].

Tablo 2.8. Çeşitli kanserlerde PI3K/AKT/mTOR yolağına etki eden çalışılacak miRNA'lar ve hedefleri

miRNA	Kanser	Hedef	Referans
miR-7 (Aşağı Regüle)	Akciğer Kanseri	PIK3R3	[224]
	Hepatosellüler karsinom	PIK3CD	[214]
	Melanom	PI3K/AKT	[225]
	Mide Kanseri	EGFR	[226]
	Mide Kanseri	mTOR	[227]
miR-17 (Yukarı Regüle)	Prostat Kanseri	PTEN	[228]
	Osteosarkom	PTEN	[175]
	Hepatosellüler karsinom	AKT	[229]
	Mantle hücreli lenfoma	PI3K/AKT	[230]
	Laringeal skuamöz hücreli karsinom	PIK3R1	[192]

Tablo 2.8. Çeşitli kanserlerde PI3K/AKT/mTOR yolagina etki eden çalışılacak miRNA'lar ve hedefleri (devamı)

miRNA	Kanser	Hedef	Referans
miR-21 (Yukarı Regüle)	Mesane Kanseri	PTEN, AKT	[231]
	Hepatosellüler karsinom	PTEN, AKT	[232]
	Böbrek kanseri	AKT/mTORC1	[233]
	Servikal kanser	mTOR	[234]
	Akciğer adenokarsinom	PIK3R1	[235]
miR-125b (Aşağı Regüle)	Troid Kanseri	PIK3CD	[198]
	Serviks Kanseri	PIK3CD	[236]
	Servikal kanser	mTOR	[234]
	Ewing sarkomu	PIK3CD	[237]
miR-145 (Aşağı Regüle)	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	mTOR	[238]
	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	EGFR/PI3K/AKT	[239]
	Mesane Kanseri	PI3K/AKT	[204]
	Laringeal skuamöz hücreli karsinom	PI3K/AKT	[240]
	Tiroid kanseri	AKT3	[241]
	Özofagus skuamöz hücreli karsinom	AKT3	[207]
miR-155 (Yukarı Regüle)	Kronik miyeloid lösemi	mTOR	[242]
	Meme Kanseri	mTOR	[243]
	Osteosarkom	PTEN	[244]
	Hepatoselüler karsinom	PIK3R1	[245]
	Diffüz büyük B hücreli lenfoma	PIK3R1	[246]
miR-206 (Aşağı Regüle)	Epithelial ovarian kanser	AKT/mTOR	[247]
	Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu	PTEN/AKT/mTOR	[248]
	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	PI3K/AKT/mTOR	[249]
	Akciğer Kanseri	c-Met/PI3k/Akt/mTOR	[250]
	özofagus skuamöz hücreli karsinom	c-Met/PI3k/Akt/mTOR	[251]

Tablo 2.8. Çeşitli kanserlerde PI3K/AKT/mTOR yolağına etki eden çalışılacak miRNA'lar ve hedefleri (devamı)

miRNA	Kanser	Hedef	Referans
miR-221 (Yukarı Regüle)	Serviks Kanseri	PTEN	[252]
	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve hepatokarsinom	PTEN ve TIMP3	[176]
	Hepatoselüler karsinom	PI3K-AKT-mTOR	[253]
	Osteosarkom	PTEN	[254]
	Oral skuamöz hücreli karsinom	PIK3R1	[193]
	Meme kanseri	PIK3R1	[255]
miR-222 (Yukarı Regüle)	Mesane Kanseri	PTEN, AKT	[231]
	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve hepatokarsinom	PTEN ve TIMP3	[176]
	Hepatosellüler karsinom	AKT	[256]
	Nazofaringeal karsinom	PTEN	[257]
miR-223 (Yukarı Regüle)	Hepatoselüler karsinom	mTOR	[217]
	Servikal kanser	mTOR	[234]
	Epitelyal yumurtalık kanseri	PTEN	[258]

Bu çalışmada ekspresyon düzeyleri belirlenecek miRNA'ların çeşitli kanserlerdeki hedefleri Tablo-2.8'de özetlenmiştir. Akciğer kanserinde miR-7'nin hedef molekül olarak PIK3R3 olarak belirlenmiştir. miR-7 PIK3R3 ekspresyonunu bastırmaktadır [224]. MiR-17-5p'nin aşırı ekspresyonu yumurtalık kanseri hücrelerinin hayatta kalma oranını arttırmakta, apoptozunu ise azaltmaktadır. miR-17-5p, yumurtalık kanseri hücrelerinde PTEN'in aşağı regülasyonu yoluyla AKT'yi aktive etmektedir [259]. miR-21-5p, normal akciğer dokularına göre akciğer adenokarsinom dokularında önemli ölçüde yukarı regüle edilir ve bu yüksek ekspresyon, kötü prognoz ile ilişkilidir. Akciğer kanserinde miR-21-5p'nin hedef geni olarak PIK3R1 belirlenmiştir [235]. miRNA-125b, çeşitli kanserlerde aşırı eksprese edilir. Servikal karsinomda miR-125b hedefi olarak fosfoinositid 3-kinaz katalitik alt birim deltasını (PIK3CD) tanımlanmıştır. HeLa serviks kanseri hücrelerinde miR-125b'nin aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonunu azaltıp, apoptozu indüklemiş ve PIK3CD ekspresyonunu aşağı regüle etmiştir. Bu sonuç, miR-125b'nin PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu hedefleyerek tümör büyüme aktivitesini baskıladığını ve etkili tedaviler için bir hedef sağlayabileceğini göstermektedir[236]. miR-145 invaziv hipofiz adenomunda (IPA) AKT3'ü hedefleyerek mTOR sinyal yolunu inhibe etmektedir [260]. Hepatoselüler karsinom [245] ve diffüz büyük B hücreli lenfomada [246] fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)-AKT yolunun negatif düzenleyicisi olan PIK3R1 (p85a), miR-

155'in doğrudan hedefidir. Epitelyal yumurtalık kanserinde, miR-206'nın aşağı regülasyonu metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Yumurtalık kanseri hücre hatlarında miR-206 ekspresyonu aşağı regüle edilmiştir. miR-206, doğrudan c-Met'i hedefleyerek, c-Met/AKT/mTOR sinyal yolunu inhibe eder ve kanser hücrelerinin gelişimini engeller [247]. miR-221 birçok kanserde olduğu gibi osteosarkomda da aşırı eksprese edilir, yani onkogen olarak işlev görür. PTEN miR-221'in doğrudan hedefidir. miR-221 PTEN ekspresyonunu regüle ederek; PI3K/AKT/mTOR yoluna etki eder [254]. Hepatosellüler karsinomda miR-222 aşırı eksprese edilir ve AKT sinyalini aktive ederek hepatosellüler karsinom hücrelerinde metastatik etki göstermektedir [256].

2.3.6. Endometrial Kanser ve miRNA'lar

Endometrial kanserde de düzensiz miRNA ekspresyonu görülmektedir. Bu düzensizlikler endometrial kanser tanısında biyobelirteç olarak, prognoz ve nüks takibinde, evre ve derece belirmesi hatta tedavi aracı olarak da kullanılabilir. MiR-9, miR-92a, miR-141, miR-182, miR-183, miR-186, miR-200a, miR-205, miR-410, miR-429, miR-1228 endometrial kanserde yukarı regüle edilmiş mikroRNA'lar olarak tespit edilmiştir. miR-99b, miR-143, miR-145, miR-193b ve miR-204 endometrial kanserde aşağı regüle edilir [261].

miR-29b endometrial kanser hücrelerinin proliferasyon, kemosenitivite, migrasyon ve invazyonu üzerinde etkilidir. miR-29b, proliferasyonu inhibe etmekte ve endometrial kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonunu azaltmaktadır. miR-29b, PTEN'in 3' UTR'sine bağlanarak PTEN ve p-AKT'nin ekspresyon seviyesini değiştirmektedir. Normal dokulara göre endometrial kanser dokularında aşağı regüle edilmektedir [262]. miR-99a ekspresyonu endometrial kanser dokularında önemli ölçüde bastırılmaktadır. Endometrial kanser hücre hatlarında in vivo miR-99a aşırı ekspresyonu deneysel olarak oluşturulduğunda, proliferasyonunun inhibisyonuna, hücre döngüsünün G1/S faz geçişinin bloke edilmesine, hücre apoptozunun indüklenmesine, hücre invazyonunun baskılanmasına ve tümör büyümesinin inhibisyonuna neden olmaktadır. miR-99a'nın hedefi PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun iki önemli üyesi AKT1 ve mTOR'dur [263].

Tablo 2.9. Endometrial kanserde ifade edilen bazı miRNA'lar ve hedefleri

miR Adı	İfade Düzeyi	Hedef	Referanslar
miR-29b	Aşağı	PTEN	[262]
miR-99a	Aşağı	AKT1, mTOR	[263]
miR-101	Aşağı	EZH2, MCL-1, FOS, mTOR, COX-2	[264]
miR-106b	Aşağı	PTEN	[265]
miR-152	Aşağı	DNMT1, E2F3, MET, Rictor, SOS2, NRAS, APC, PIK3R3, SOS1, PTEN, CDC25B	[266]
miR-181c	Aşağı	PTEN, NOTCH2	[267]
miR-199a-3p	Aşağı	mTOR	[268]
miR-200c	Yukarı	BRD7, BMI-1, PTEN, PTENP1	[269]
miR-205	Yukarı	ESRRG, PTEN, AKT	[270]
miR-494-3p	Yukarı	PTEN	[271]
miR-495	Aşağı	GSK3B, NRAS, TCF4, PIK3CB, PIK3R3, CCND1, AXIN2, PIK3R1, SOS1, PIK3CA, FOXO3, PTEN	[195]

miR-101 endometrial kanserde aşağı regüle edilmektedir. miR-101 ile mTOR mRNA'sının 3'-UTR'si arasında bağlanma bölgesi bulunmaktadır. miR-101 mTOR ekspresyonuna etki ederek proliferasyon, apoptoz ve invazyona etkilemektedir. Endometrial kanserde miR-101 aşağı regüle edilirken mTOR ekspresyonu yükselmiştir. Hücre hattı çalışmalarında miR-101 mimik transfeksiyonu mTOR ekspresyonunu, koloni oluşumunu ve invazyonu azalmış, apoptozu ise artmıştır [264]. miR-106b endometrial kanserde yukarı regüle edildiği bildirilmiştir. miR-106b'nin aşağı regüle edildiğinde proliferasyonu baskıdığı, apoptozu desteklediği gösterilmiştir. miR-106b PTEN'i hedefleyerek; AKT/mTOR sinyal yolunu regüle etmektedir. Böylece miR-106b endometrial kanser hücrelerinde proliferasyonu engellemekte, apoptozu desteklemektedir [265]. Endometrial kanserde miR-152 ise aşağı regüle edilmektedir. Endometrial kanser hücre hattında miR-152 ekspresyonunun restorasyonu, in vitro ve in vivo olarak tümör hücresi büyümesini inhibe etmektedir. E2F transkripsiyon faktör 3 (E2F3), MET ve rictor miR-152'nin hedefleridir [266]. Endometrial kanserde aşağı regüle edilen miR-181c PTEN'i hedefleyerek

östrojene bağımlı endometrial karsinom hücre büyümesini etkilemektedir [267]. Normal endometriyum dokuları ile karşılaştırıldığında endometrial kanser doku ve hücrelerinde miR-199a-3p'nin azalmış ekspresyonu gözlenir. Hücre hattı deneylerinde miR-199a-3p mimikleri transfekte edilmiş endometrial kanser hücrelerinin proliferatif kapasitesi inhibe edilirken, miR-199a-3p inhibitörleri transfekte edilmiş hücreler artan proliferasyon göstermiştir. miR-199a-3p'nin, mTOR 3' UTR'sini hedefleyerek; mTOR protein ekspresyonunu engellediği bildirilmiştir [268]. miR-205 PTEN'in 3'-UTR'si ile etkileşerek PTEN ifadesini aşağı regüle etmektedir. miR-205 ayrıca AKT yolunun düzenlenmesi üzerinde aşağı yönde bir etkiye sahiptir. Yukarı eksprese edilen miR-205 endometrial kanserinde hücrel apoptozun inhibisyonuna yol açmaktadır [270]. miR-494-3p ekspresyon seviyeleri, normal dokulara kıyasla endometriyal kanser dokularında önemli ölçüde yukarı regüle edilmektedir. Ayrıca, endometrial kanserli hastalarda miR-494-3p'nin yukarı regülasyonu prognoz ile ilişkilidir. Endometrial kanser hücrelerinde miR-494-3p'nin doğrudan hedefi PTEN'dir. miR-494-3p'nin aşırı ekspresyonu, PTEN ekspresyonunu inhibe etmesi nedeniyle aşağı akış PI3K/AKT sinyal yolu aktive olmaktadır [271]. miR-495 in vitro endometrial kanser hücrelerinde PIK3R1'i doğrudan hedefleyerek tümör baskılayıcı olarak hareket etmektedir. Hücre hattına miR-495 mimik transfekte edildikten sonra PIK3R'in Bcl-2'nin ve VEGF ifadesi aşağı, Bax ve kaspaz 3 ifadesinin yukarı regüle edildiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar miR-495'in in vitro endometrial kanser hücrelerinde transkripsiyon sonrası seviyede PIK3R1'i doğrudan hedefleyerek tümör baskılayıcı gen olarak hareket ettiğini göstermektedir [195].

Endometrial kanser dokularında mTOR ekspresyonu artmakta ve buna miR-99a/miR-100/miR-199b'nin azalmış ekspresyonu eşlik etmektedir. miR-99a/miR-100/miR-199b mTOR'u hedeflemektedir. Ayrıca miR-100'ün genel sağkallımla ilişkili prognostik bir belirteç olduğu düşünülmektedir. miR-99a, miR-100 ve miR-199b endometrioid endometrial karsinomun erken tespiti ve prognoz takibinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir [272]. miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 gibi miR-200 ailesi üyeleri endometrial kanserde önemli ölçüde yukarı regüle edilmektedir [274, 275]. Endometrial kanserin aksine diğer birçok malignitede miR-200 ailesi aşağı regüle regüle edilmektedir ve epitelyal mezenkimal geçiş ile ilişkilidir [124]. miR-200 ailesinin yukarı regülasyonu endometrial kansere özgü karakteristik bir değişim gibi görünmektedir [274, 275]. miR-200 aile üyeleri histolojik derece 1 ve klinik FIGO evre IA yani hastalığın erken evresinde yukarı regüle edilmektedir. Yani miR-200 ailesi endometrial kanserde onkogenezi kolaylaştırarak hastalığın başlangıç aşamasında önemli rol oynamaktadır. MiR-203 ve miR-205 endometrial kanserde yukarı regüle edilmektedir. Buna karşın diğer malignitelerde azalmış ekspresyonları gözlenmiştir. miR-203 ve miR-205 ileri hastalık evresi ve kötü prognoz ile ilişkilidir [275].

Endometrial kanserde yüksek oranda yukarı regüle edilmiş miR-205 ile miR-183 birlikte hastalık nüksü olan olgularda anlamlı olarak artmıştır [276]. miR-410'un azalmış ifadesi endometrioid endometrial kanserde rapor edilmiştir [274]. Ratner ve diğerleri kromozom 14'te (14q32.31) aynı lokusu işgal eden miR-487b'nin de aşağı regülasyonu gözlemlemiştir. Bu iki miRNA'nın azalan ekspresyonu, 14q32 bölgesinin endometrial kanserlerde sıklıkla silindiği ve daha kötü prognozla bağlantılı olduğunu göstermektedir [277]. MiR-92a'nın ekspresyonu, klinik ve histolojik olarak daha ileri tümörlerde daha yüksektir. Ayrıca, hastalık nüksü olan hastalarda artma eğilimindedir. Bu da miR-92a'nın endometrioid endometrial kanserdeki onkojenik rolünü ve daha agresif tümörlerle ilişkisini ortaya koymaktadır [276]. Ökaryotik translasyon başlatma faktörü 4E (eIF4E), çeşitli malignitelerde ve bunların uzak metastazlarında aşırı eksprese edilen bir onkogendir. Endometrial kanserde eIF4E yukarı ifadesi kötü prognoz ve yüksek patolojik derece ile ilişkilidir. miR-320a ve miR-340-5p ekspresyon seviyeleri, normal dokulardakilere kıyasla endometrial kanser dokularında aşağı regüle edilmektedir. Bu da bu miRNA'ların endometrial kanserde tümör baskılayıcı genler olarak hizmet ettiğini göstermektedir. miR-320a ve miR-340-5p, eIF4E mRNA'nın 3'-UTR'sine bağlanabilir, böylece endometrial kanser hücrelerinde eIF4E ve fosforile edilmiş (p)-eIF4E ekspresyonunun aşağı regülasyonu sağlar. miR-320a veya miR-340-5p'nin aşırı ekspresyonu, HEC-1A hücre hattında migrasyonu ve invazyonu etkili bir şekilde bastırmıştır. miR-320a veya miR-340-5p transfeksiyonunu sonrasında eIF4E ve p-eIF4E'nin aşağı regülasyonu, matris metalopeptidaz 3 (MMP-3) ve MMP-9'un artmış ekspresyonunu azaltarak; endometrial kanser hücrelerinin invazyonunu ve metastatik kapasitesi azalmaktadır [278]. miR-23a, endometrial kanser dokularında parakarsinom dokularına kıyasla daha az eksprese edilmekte ve miR-23a'nın aşırı ekspresyonu, endometrial kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu inhibe etmektedir. SIX1 (sine oculis homeobox homolog 1) miR-23a'nın aşağı akış hedefidir ve miR-23a SIX1 ekspresyonunu azaltmaktadır. Endometrial kanser dokularında miR-23a ve SIX1 ekspresyonu arasında negatif bir ilişki vardır [279]. miR-29-a, -b ve -c ekspresyon seviyeleri endometrial kanserde aşağı regüle edilir. Hücre hattı çalışmalarında miR-29c'nin endometrial kanser hücre hatlarına dahil edilmesi proliferasyonu azaltıp, apoptozu artırmıştır. Mevcut sonuçlar, miR-29c'nin tip 1 endometrial kanser için potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir [280]. miR-449a, tümör oluşumunda rol oynamaktadır ve miR-449a'nın daha düşük ekspresyonu, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. miR-449a ifadesinin endometrial kanserin derecesi ile ters orantılı olduğunu bulunmuştur. miR-449a'nın aşağı regülasyonu, endometrial kanser hastalarında tümör ilerlemesi ve kötü prognoz ile koreledir. Fonksiyonel analizlerin sonuçları, insan endometrial kanser hücrelerinde miR-449a'nın aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu, invazyon ve metastazı azalttığını ortaya koymuştur [281].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Alet, Gereç ve Cihazlar

- Mikropipet Seti (10-20-100-200-1000 µl)
 - Işık Mikroskobu (Olympus)
 - Mikrosatrüf (Hettich)
 - Vorteks Karıştırıcı
 - Steril Kabin
 - Isı Bloğu (BioRad)
 - RT-PCR (Roche Light Cycler 480 II)

Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

- 2.0 ml Ependorf Tüpler
- Steril 8'li Strip Tüpler
- Steril Pipet Uçları
- İnnuPREP FFPE total RNA Kit (Analytic Jena)
- cDNA Synthesis Kit (ABM)
- miRNA Ekspresyon Kiti- İşaretli Primer Seti (ABM)
- miRNA Ekspresyon Kiti-İşaretli Primer Dizisi (ABM)
- Sybr Green Master Mix (ABM)

3.2. Yöntem

3.2.1.Çalışma Gruplarının Oluşturulması

1 Aralık 2014 ile 1 Aralık 2020 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğinde histerektomi operasyonu olan, 48 endometrioid adenokarsinom tanısı konmuş hastanın Mersin Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan doku örneği ile Hasta Grupları ve 32 sağlıklı kişinin arşivde bulunan endometrium dokuları Kontrol Grupları olarak çalışmaya dahil edildi.

Materyallerin araştırmaya dahil edilme kriterleri:

Endometrial kanser tanısı konmuş hastalara ait örnekler differansiasyonuna göre Grade 1,2 ve 3 olarak derecelendirilerek; Hasta Alt Grupları, sağlıklı bireylerden alınmış proliferatif ve sekretuar fazdaki örneklerle de Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) olmak üzere Kontrol Alt Grupları oluşturuldu.

- Hasta grubunu oluşturacak endometrial kanser örneklerini dahil edilme kriterleri:

- a) Reprodüktif dönemdeki (18-50 yaş arası) bireylerin dokuları çalışmaya dahil edildi.
- b) Endometrial kanseri tanısı konmuş hastalara ait örnekler differansiasyonuna göre;

- Grade 1 (n=16)
- Grade 2 (n=16)
- Grade 3 (n=16) derecelendirilerek çalışmaya dahil edildi.

- Sağlıklı kontrol grubu örneklerinin dahil edilme kriterleri:

- a) Jinekolojik olarak herhangi bir hastalık tanısı olmayan ve reproduktif dönemdeki (18-50 yaş arası) bireylerin endometrial dokuları çalışmaya dahil edildi.
- b) Sağlıklı bireylerden alınan örnekler;
 - Proliferatif Faz (n=16)
 - Sekretuar Faz (n=16) olmak üzere çalışmaya dahil edildi.

‘Endometrial Kanserde PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağını etkileyen miRNA’ların Araştırılması’ başlıklı çalışma Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun **23/12/2020** tarih ve **2020/791** sayılı kararı ile onaylandı.

3.2.2. Çalışma Örneklerinin Elde Edilmesi

Mersin Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan, Hasta Grupları ve Kontrol Grupları dahil edilme kriterlerini sağlayan 1 Aralık 2014 -1 Aralık 2020 tarihleri arasında arşiv doku örnekleri tarandı. Doku örneği alınacak parafin bloklar belirlendi. Doku arşivinde bulunan bloklardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınarak; kesitler lamaların üzerine alınıp, hematoksilen-eozin boyalı preparatların histolojik incelemesi yapıldı. Böylece Kontrol ve Hasta Gruplarına dahil edilecek doku örnekleri histopatolojik olarak incelenerek tanının kontrolü yapıldı. Sonrasında bistüri ile lam üzerinden alınarak; ependorf tüplere konuldu. Ependorf tüplere her örnekten çıkarılan dokunun büyüklüğüne bağlı olarak 5 µm’lik 8-10 yaprak doku aktarıldı. Ependorf tüplere aktarılan doku örnekleri çalışma gününe kadar +4°C’de saklandı.

3.2.3. İn Siliko Analizler

3.2.3.1. miRNA’ların ve Hedeflerinin Belirlenmesi

Kapsamlı bir literatür araştırması sonrası PI3K/AKT/mTOR yolağına etki eden miRNA’lar üzerine endometrial kanserde bir çalışma yapılmadığı tespit edildi. Diğer kanser türlerinde PI3K/AKT/mTOR yolağına etki eden miRNA’lar hakkındaki literatür taraması gerçekleştirilerek, çalışma sayılarına göre miRNA’lar belirlendi. MiRCancer (<http://mircancer.ecu.edu/>) ve miRDisease (<http://mir2disease.org>) çevrimiçi veritabanları kullanılarak literatür taramasından elde edilen miRNA’lar ve ilişkili olduğu kanser tipleri doğrulanarak; çalışma için miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-125-b-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p, miR-222-3p ve miR-223-3p olmak üzere 10 adet miRNA

belirlendi. TargetScan web sunucusu (<http://www.targetscan.org>) kullanılarak; bu 10 adet miRNA'nın PI3K/AKT/mTOR yolağında hangi genleri hedeflediği tespit edildi.

3.2.3.2. miRNA'ların Birincil, İkincil ve Üçüncül Yapılarının Belirlenmesi

miRBase (<https://www.mirbase.org/>) mikroRNA veritabanı kullanılarak; çalışmaya dahil edilen miRNA'ların birincil yapıları belirlendi. Seçilen miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki katlanma afinitesini doğrulamak için RNAfold web sunucusu (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) kullanılarak; ikincil yapılar belirlendi. Elde edilen nokta parantezli yapılar aracılığıyla RNA COMPOSER (<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>) kullanılarak; üçüncül yapıları oluşturuldu.

3.2.3.3. Argonaute Proteininin Yapı Hazırlığı

Argonaute (AGO) proteini ve miRNA'lar arasındaki ve ayrıca miRNA'lar-mRNA'lar dubleksleri arasındaki bağlanma mekanizmasını inceleyerek; RNA susturma mekanizmasını anlamak için moleküler yerleştirme (docking) çalışmaları gerçekleştirildi. AGO proteininin üç boyutlu yapısı (PDB ID: 3F73) protein veri bankasından (<https://www.rcsb.org/>) alındı. AGO proteininin yapı hazırlama ve düzeltme işlemleri Discovery Studio 3.5 paketi kullanılarak yapıldı.

3.2.3.4. Moleküler Yerleştirme

AGO proteini ve miRNA-mRNA dubleksleri arasında PatchDock web sunucusu (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>) algoritması kullanılarak moleküler yerleştirme gerçekleştirildi. Moleküler yerleştirme sonrasında moleküler etkileşim Discovery Studio 3.5 paketi, PyMol ve PLIP Protein-Ligand Interaction Profiler web sunucusu (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) kullanılarak incelendi.

3.2.4. miRNA'ların Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) örneklerden miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p ve miR-222-3p'nin ekspresyon düzeylerinin tesbiti için ABM marka miRNA ekspresyon kitleri kullanıldı. Analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Deparafinizasyon ve miRNA izolasyonu

1. Ependorf tüpündeki FFPE doku örnekleri 1 dakika boyunca maksimum hızda santrifüjlendi.
2. Ependorf tüpüne 400 µl lysis buffer MA ve 40 µl proteinaz K eklenerek, 10 saniye boyunca vorteksle karıştırıldı. Reaksiyon tüpü termal karıştırıcıda 30 dakika boyunca 65 °C'de inkübe edildi.
3. Liyziş adımından sonra numune maksimum hızda 3 dakika santrifüjlendi. Süpernatant RNaz içermeyen ve güvenli kilitli 1,5 ml'lik bir reaksiyon tüpüne aktarıldı. Aktarım sırasında pellet karıştırılmadan ve katı parafin parçacıklarının transferi engellendi.
4. Numuneye 600 µl etanol (%96-99) eklenip, 10 saniye boyunca vortekslendi.
5. 600 µl numuneyi spin filtresi üzerine uygulandı. Kapağı kapatıp, 10.000 x g (~12.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Kalan numune spin filtresine aktarıldı, kapağı kapatıldı ve 10.000 x g (~12.000 rpm)'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Spin filtresinin kapağı açılarak; 500 µl Wash Buffer C eklendi, kapağı kapatılarak; 10.000 x g'de (~12.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
8. Spin filtresi açılıp; 650 µl Wash Buffer BS eklendi, kapağı kapatılarak; 10.000 x g'de (~12.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
9. Spin filtresinin kapağı açılarak; 650 µl etanol (%96-99) eklendi, kapağı kapatılarak; 10.000 x g'de (~12.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi. Filtrat atılarak; spin filtresini yeni bir 2.0 ml tüpe yerleştirildi. Tüm etanol kalıntılarını gidermek için maksimum hızda 3 dakika santrifüj edildi.
10. Spin filtresini 1,5 ml'lik bir elüsyon tüpüne yerleştirildi. Spin filtresinin kapağını dikkatlice açılarak; 50 µl RNaz içermeyen su eklenip, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 10.000 x g'de (~12.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.

3.2.4.2. Komplementer DNA eldesi

1. Komplementer DNA'lar(cDNA) ABM cDNA sentez kiti kullanılarak gerçekleştirildi.
2. Ters transkripsiyon (RT) reaksiyonları, RNase içermeyen bir ortamda bir araya getirildi. Kullanmadan önce tek tek bileşenleri iyice çözüldü ve karıştırıldı. Reaksiyon buz üzerinde birleştirildi.

Tablo 3.1. cDNA eldesi için bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim
RNA	5 µl
2x miRNA cDNA Synthesis Super Mix	10 µl
Enzim Mix	2 µl
RNase-Free H ₂ O	3 µl
Toplam	20 µl

3. Reaksiyon bileşenleri karıştırılarak; kısa bir süre santrifüj edildi.
4. PCR cihazında 37°C'de 30 dakika, 42°C'de 15 dakika ve 70 °C'de 10 dakika ısı protokolü uygulanarak inkübe edildi ve cDNA sentezini gerçekleştirildi.
5. Reaksiyon buz üzerinde soğutuldu. Sentezlenen cDNA kullanılabildiği kadar -20°C'de saklandı.

3.2.4.3. Real Time PCR Analizi ile miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Real Time-PCR için tepkime bileşenleri ABM BrightGreen Master Mix ve miRNA PCR Primer Mix kitleri kullanılarak hazırlandı. Kullanmadan önce tek tek bileşenler karıştırıldı ve Tablo 3.2.'deki hacimlerde bileşenler buz üzerinde birleştirildi.

Tablo 3.2. Real Time PCR analizi için bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim
BrightGreen Master Mix	10 µl
miRNA Forward Primer 300 nM	1 µl
miRNA Reverse Primer 300 nM	1 µl
cDNA	2 µl
Nuclease-free H2O	6 µl
Toplam Hacim	20 µl

2. miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p ve miR-222-3p'nin primer dizileri Tablo 3.3'te bulunmaktadır. Bu çalışmada snoRNA U44 referans geni kullanıldı.

Tablo 3.3 . Primer Dizileri

miRNA	Primer Yapı (5' -> 3')
hsa-miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU
hsa-miR-17-5p	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-145-5p	GUCCAGUUUUCCCAGGAAUCCCU
hsa-miR-155-5p	UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU
hsa-miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
hsa-miR-221-3p	AGCUACAUGUCUGCGUGGGUUUC
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU

3. Reaksiyon bileşenleri buz üzerinde bir araya getirildikten sonra sentezlenen cDNA'lar ile birleştirilerek santrifüj edildi. Aşağıdaki çalışma protokolüne göre Real Time-PCR cihazında miRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

Tablo 3.4. Real Time PCR çalışma protokolü

DENATÜRASYON (Döngü Sayısı:1)	AMPLİFİKASYON (Döngü Sayısı: 40)	ERİME EĞRİSİ (Döngü Sayısı:1)	SOĞUTMA (Döngü Sayısı:1)
95 °C'de 10 dk.	95 °C'de 10 saniye	95 °C de 30 saniye	40 °C'de 1 dakika
	60 °C'de 15 saniye	50 °C'de 1 dakika	
	95 °C'de 10 dakika	90 °C'de denatürasyon sonuna kadar devam eder.	
	72 °C'de 30 saniye -Okuma		

3.2.5. İstatiksel Analizler

miRNA'ların ekspresyon düzeylerindeki değişimi belirlemek için Livak yöntemi [282] ile her bir miRNA için $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ değerleri hesaplandı. miRNA'ların C_t değerleri housekeeping snoRNA U44 C_t değerine göre normalize edildi. Delta C_t (ΔC_t) aşağıdaki formül ile hesaplandı:

$$\Delta C_t = C_t (\text{miRNA}) - C_t (\text{housekeeping})$$

Göreceli ekspresyon belirlemek için $\Delta\Delta C_t$ değerleri kontrol gruplarına göre hesaplandı.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Örnek}) - \Delta C_t (\text{Kontrol ortalaması})$$

Kat değişimini belirlemek için de $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ değerleri hesaplandı. İstatiksel analizler R Studio programı kullanılarak yapıldı. Hesaplanan $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ değerlerinin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Veriler normal dağılım göstermediği için gruplar arasında ilgili miRNA ekspresyonları bakımından farklılıkları saptamak amacıyla parametrik olmayan yöntem Kruskal Wallis - H testi ve post-hoc olarak Dunn testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarını Tanımlayıcı Bilgiler

Mersin Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bulunan endometrial kanser tanısı konmuş hastalara ait örnekler differansiasyonuna göre Grade I, II, III olarak derecelendirilerek; alt Hasta Grupları, sağlıklı bireylerden alınmış proliferatif ve sekretuar fazdaki örneklerle de Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) olmak üzere kontrol alt grupları oluşturuldu (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının dağılım oranları

Grup	Alt Grup	Örnek Sayısı (n)	Örnek Yüzdesi (%)
Hasta Grubu	Grade 1	16	20
	Grade 2	16	20
	Grade3	16	20
Kontrol Grubu	Proliferatif Faz	16	20
	Sekretuar Faz	16	20
Toplam		80	100

4.2. İn Siliko Analizler

4.2.1. miRNA'ların Hedefleri

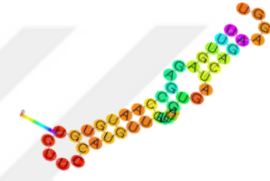
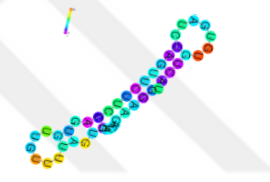
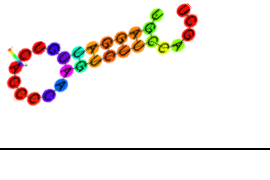
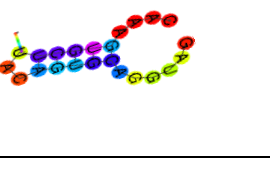
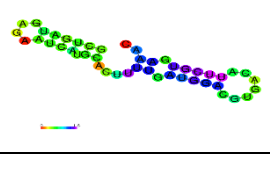
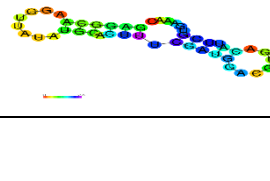
miRNA'ların aracılık ettiği gen düzenlemesini tanımlamak için kapsamlı literatür araştırması ve çevrimiçi veritabanlarının araştırılması gerçekleştirilerek çalışmaya dahil edilecek mikroRNA'lar belirlendi. miRNA'ların ilgili genlerin hangi bölgelerine etki ettiklerini belirlemek için mirBase veritabanı aracılığıyla (www.mirbase.org) çalışılacak miRNA'ların primer yapıları tespit edildi. Bu miRNA'ların primer yapıları Tablo 3.3'de bulunmaktadır.

TargetScan web sunucusu [283] (<http://www.targetscan.org>) kullanılarak; çalışılacak miRNA'ların PI3K/AKT/mTOR yolağındaki hangi genleri hedeflediği tespit edildi. miRNA'ların hedeflerinin mRNA'larının 3' UTR bölgesine bağlanma bölgeleri belirlendi.

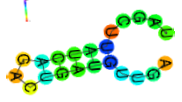
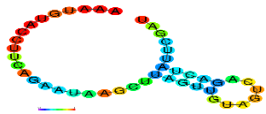
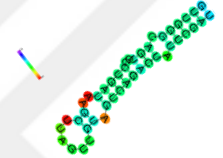
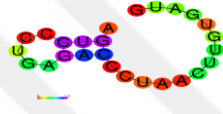
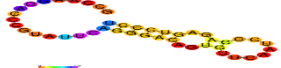
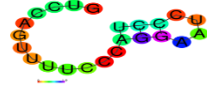
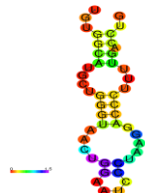
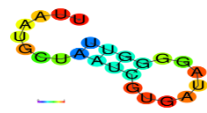
Tablo 4.2. miRNA hedeflerinin bağlanma bölgeleri

Pozisyon	Bağlanma Bölgesi
PIK3CD 3' UTR (268-275 pozisyonu)	5' . . . GGAUUGUCACCCCAAGUCUUCCA . . .
hsa-miR-7-5p	3' UGUUGUUUUAGUGAU CAGAAGGU
PIK3R3 3' UTR (2935-2942 pozisyonu)	5' . . . UUUGAGAGCCAAUGUGUCUUCCA . . .
hsa-miR-7-5p	3' UGUUGUUUUAGUGAU CAGAAGGU
PIK3CB 3' UTR (778-784 pozisyonu)	5' . . . ACUGUGUGA AUC CAGU- UCU UCCAG . . .
hsa-miR-7-5p	3' UGUUGUUUU UAG UGAUC AGAAGGU
AKT3 3' UTR (3880-3886 pozisyonu)	5' . . . UAGCUUUUCAUUAACGUCU <u>UCCU</u> . . .
hsa-miR-7-5p	3' UGUUGUUUUAGUGAU CAGAAGGU
PIK3R1 3' UTR (1331-1337 pozisyonu)	5' . . . GAGGCAAGGUUAUAUGCACUUUC . . .
hsa-miR-17-5p	3' GAUGGACGUGACA <u>UUCGUGAAAC</u>
AKT3 3' UTR (1142-1148 pozisyonu)	5' . . . GCUGAUGAGAAUCAUGCACUUUU . . .
hsa-miR-17-5p	3' GAUGGACGUGACA <u>UUCGUGAAAC</u>
PIK3R1 3' UTR (861-867 pozisyonu)	5' . . . AAAUGUACCU UCAGA --- AUAAGCUU . . .
hsa-miR-21-5p	3' AGUUGU AGUC AGAC UAUUCGAU
PIK3R1 3' UTR (1107-1113 pozisyonu)	5' . . . GUUGGG CAGUG CCUG AUAAGCUU . . .
hsa-miR-21-5p	3' AGUUGU AGUC AGAC-- UAUUCGAU
PIK3C2B 3' UTR(753-759 pozisyonu)	5' . . . GCCAAGGACCCGUAU UCAGGGAC . . .
hsa-miR-125b-5p	3' AGUGUCAAUCCCAG AGUCCCU
AKT3 3' UTR (5492-5499 pozisyonu)	5' . . . UGUGGCAUG UGGGU - AACUGGAA . . .
hsa-miR-145-5p	3' UCCCUAAG GACCCUUUGACCUG
PIK3CA 3' UTR(106-112 pozisyonu)	5' . . . GCACAAUCCAUGAAC AGCAUUAG . . .
hsa-miR-155-5p	3' UGGGGAUAGUGC UAAUCGUAAUU
PIK3R1 3'UTR (3718-3724 pozisyonu)	5' . . . UUG UCAC CAUGAGAU AGCAUUAG . . .
hsa-miR-155-5p	3' UGGGGAU AGUG CUAA---- UCGUAAUU

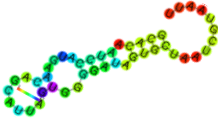
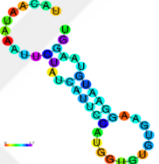
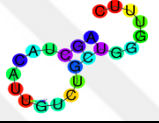
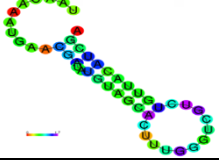
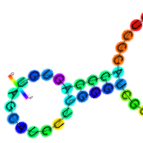
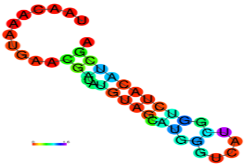
Tablo 4.3. İkincil yapılar ve minimum serbest enerjileri (MFE) (devamı)

miRNA	Hedef gene 3'UTR mRNA	Dot-Bracket gösterimi	Dublexin İkinci Yapısı	MFE (kcal/Mol)
miR-7-5p	AKT3	...([..(((((((.....)))..))))))....		-3,80
miR-7-5p	PIK3R3	(((((..(((((((.....)))..))))))....)..))))...		-7,90
miR-7-5p	PIK3CB	(((((.....)))(((((((..(.....)))..))))....))))		-3,80
miR-7-5p	PIK3CD	((((..(((.....))).....))))....		-1,80
miR-17-5p		(((((...))))....		-2,40
miR-17-5p	AKT3	(((((....))))....)((.((((.....))))....).		-8,00
miR-17-5p	PIK3R1	(((((.....))))....)(((((.....))))....		-4,20

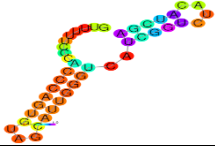
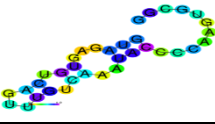
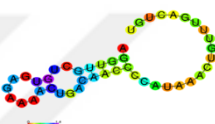
Tablo 4.3. İkincil yapılar ve minimum serbest enerjileri (MFE) (devamı)

miRNA	Hedef gene 3'UTR mRNA	Dot-Bracket gösterimi	Dublexin İkinci Yapısı	MFE (kcal/Mol)
miR-21-5p		(((((...))))....		-0,8
miR-21-5p	PI3KR1 (861-867)	((((.....))))....		-2,10
miR-21-5p	PI3KR1 (1107-1113)	(((((((...(((...((.....))))))))))))))		-8,20
miR-125b-5p		.(((.....))).....		-0,90
miR-125b-5p	PIK3CB	((((...((.....)))..))))))		-10,50
miR-145-5p		(((....)))		-1,1
miR-145-5p	AKT3	...((((...(((...((....))).....))))...))))..		-9,70
miR-155-5p		((((.....))))		-0,40
miR-155-5p	PIK3R1	((((...(((((((.....))))))))))....		-10,30

Tablo 4.3. İkincil yapılar ve minimum serbest enerjileri (MFE) (devamı)

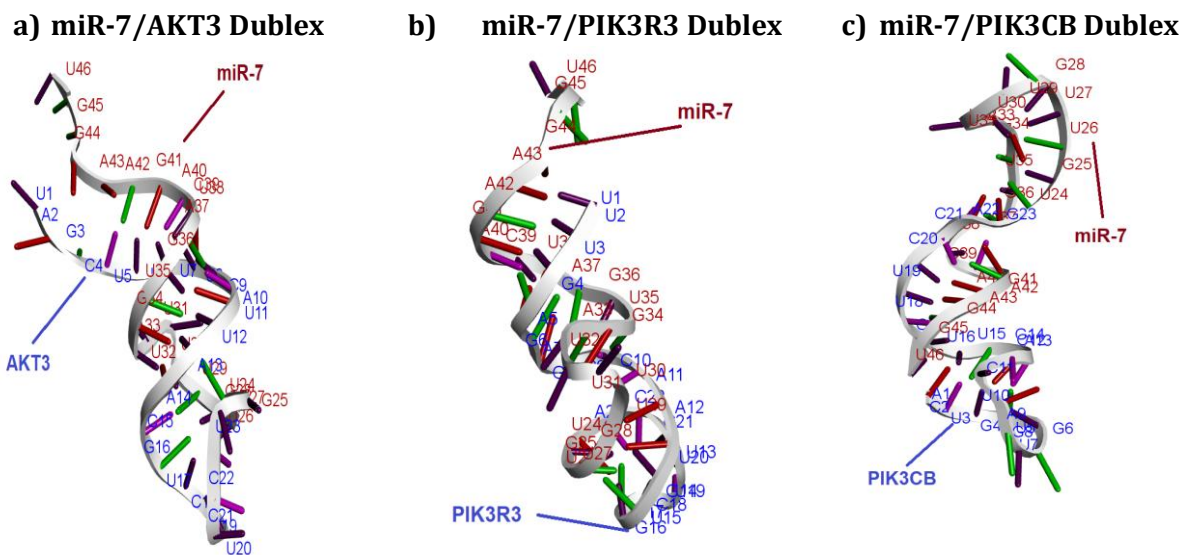
miRNA	Hedef gene 3'UTR mRNA	Dot-Bracket gösterimi	Dublexin İkinci Yapısı	MFE (kcal/Mol)
miR-155-5p	PIK3CA	(((.(((....((.....))..))))..))).....		-10,10
miR-206		.(((((((.....))))))..)		-0,90
miR-206	PIK3C2A	(((..(((((((.....))))))..)))..)		-6,60
miR-221-3p		(((.....))).....		-1,30
miR-221-3p	PIK3R1 (522-529)	(((..(((((((.....))))))..))))..)		-6,40
miR-221-3p	PIK3R1 (2854-2860)	(((((((.....))))))..)		-6,10
miR-222-3p		((((....)))).....		-3,40
miR-222-3p	PIK3R1 (522-529)	(((..(((((((.....))))))..))))..)		-6,80

Tablo 4.3 İkincil yapılar ve minimum serbest enerjileri (MFE) (devamı)

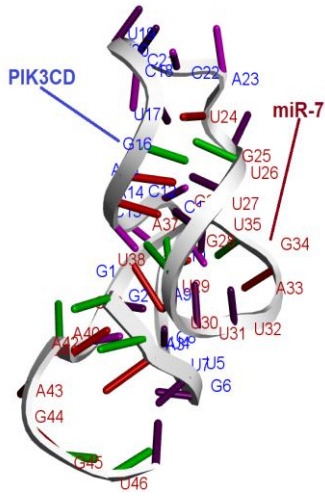
miRNA	Hedef gene 3'UTR mRNA	Dot-Bracket gösterimi	Dublexin İkinci Yapısı	MFE (kcal/Mol)
miR-222-3p	PIK3R1 (2854-2860)	(((((((.....))))))..((((.....))))		-11,70
miR-223-3p		((((...((.....))))..)).....		-0,30
miR-223-3p	PIK3C2A	.((((...((.....))...)))).....		-5,50

4.2.3. miRNA'ların Üçboyutlu Yapı Modellemesi

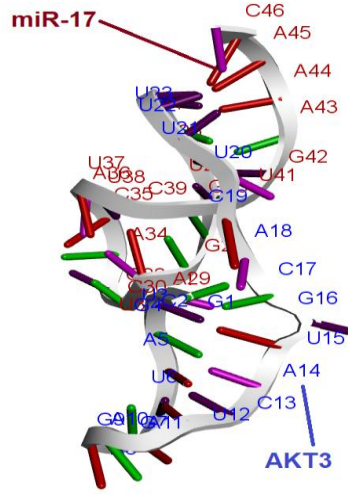
Oluşturulan iki boyutlu yapıların dot bracket nokta yapılarından da faydalanılarak; RNACOMPOSER [285] programı yardımıyla her bir miRNA ve hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesinin oluşturduğu üç boyutlu yapı modellemesi Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

**Şekil 4.1.** miRNA ve hedeflerinin oluşturduğu yapıların 3 boyutlu modellemesi

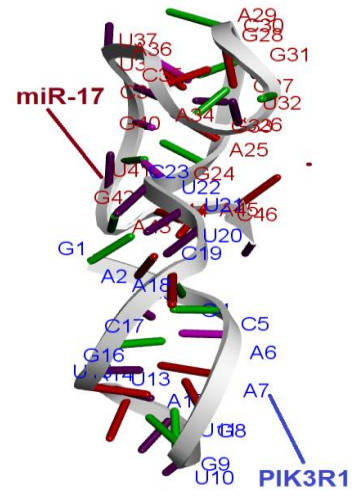
d) miR-7 /PIK3CD Dublex



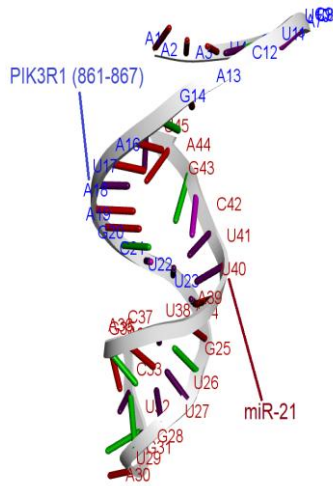
e) miR-17/AKT3 Dublex



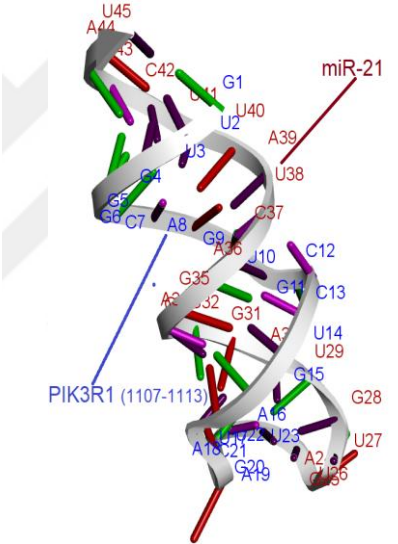
f) miR-17/PIK3R1 Dublex



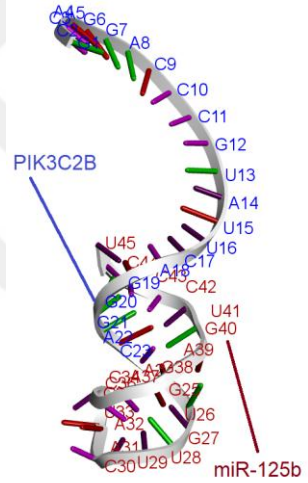
g) iR-21/PIK3R1 (861-867)



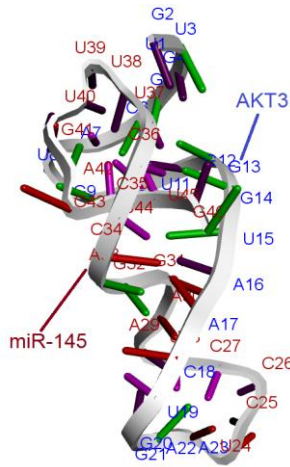
h) miR-21/PIK3R1 (1107-1113)



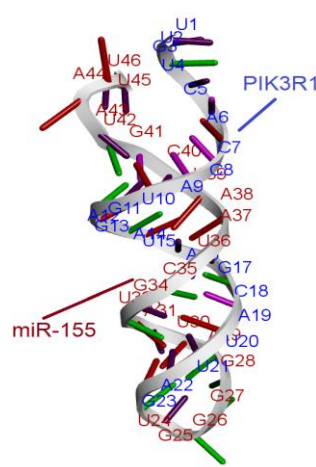
i) miR-125/PIK3C2B Dublex



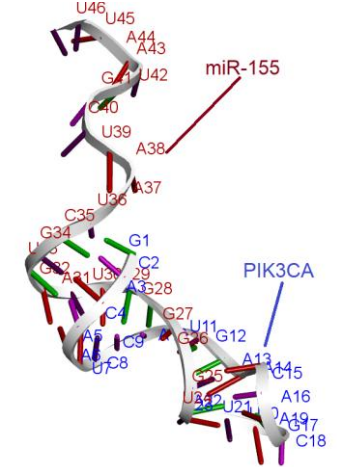
j) miR-145/AKT3 Dublex



k) miR-155/PI3KR1 Dublex

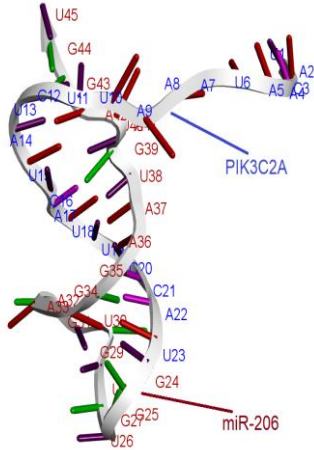


l) miR-155/PIK3CA Dublex

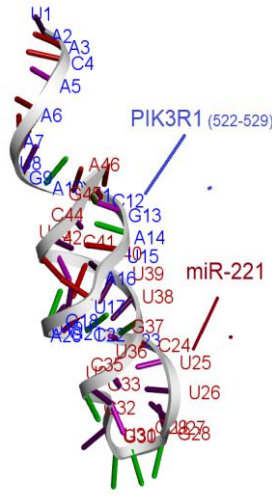


Şekil 4.1. miRNA ve hedeflerinin oluşturduğu yapıların 3 boyutlu modellemesi (devamı)

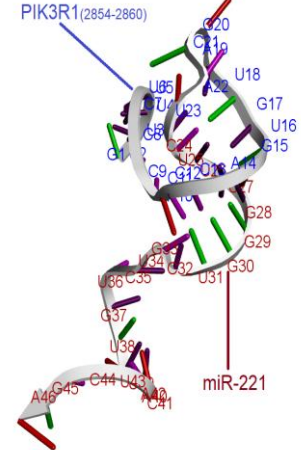
**m) miR-206/PIK3C2A
Dublex**



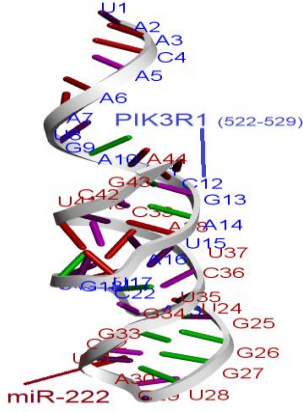
**n) miR-221/PIK3R1
(522-529)**



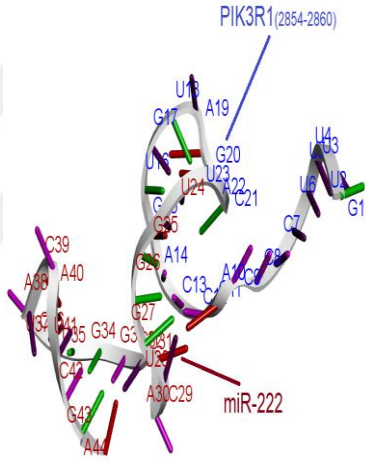
**o) miR-221/PIK3R1
(2854-2860)**



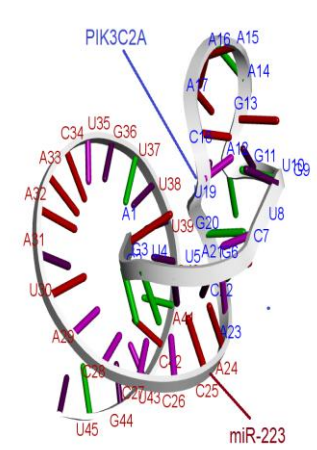
**p) miR-222/PIK3R1 (522-
529)**



q) miR-222/PIK3R1(2854-2860)



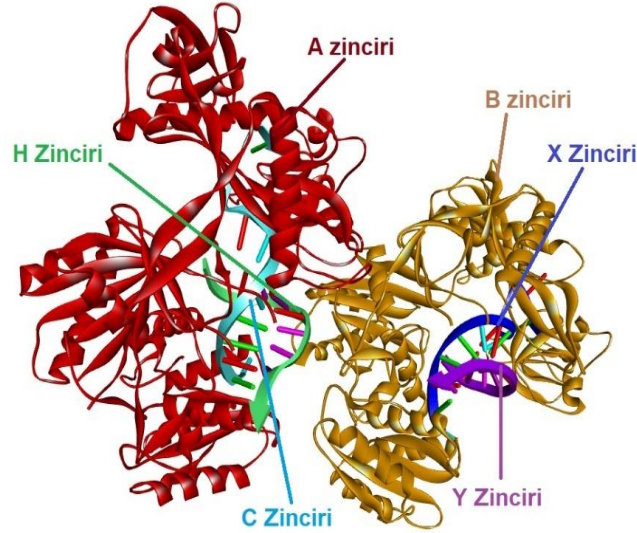
r) miR-223/PIK3C2A Dublex



Şekil 4.1. miRNA ve hedeflerinin oluşturduğu yapıların 3 boyutlu modellemesi (devamı)

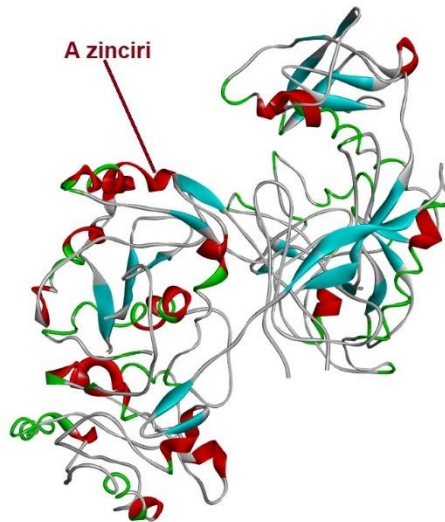
4.2.4. Argonaute Proteininin Yapısı

Protein veri bankasından alınan AGO proteininin 3D yapısı (PDB ID: 3F73) ham durumunda iki protein zinciri (A ve B), iki nükleik asit grubu (C-H zinciri ve X-Y zinciri), iki ko-faktör (Mg^{2+} molekülü), bir fosfat grubu ve 16 su molekülü içeren bir homodimerdir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Reseptör protein (3D-AGO proteini)

Protein veri bankasından alınan AGO protein dosyası, kristalize edilmiş ligandlar, su molekülü, metal iyonları ve yardımcı ko-faktörleri içeren atomlar içermeleri nedeniyle moleküler modelleme hesaplamasında hemen kullanım için uygun değildir. Bu nedenle AGO proteininin yapı hazırlama ve düzeltmesi Discovery Studio 3.5 programı kullanılarak yapıldı. Moleküler yerleştirmede AGO proteinin A zinciri kullanıldığından yapı tek zincire indirgenerek; ko-faktörler, kristalize ligandlar ve su molekülleri yapıdan çıkarıldı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Düzenlenmiş reseptör protein (3D-AGO proteini A zinciri)

4.2.5. Moleküler Yerleştirme

In silico protein-ligand yerleştirme, <https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/php.php> adresindeki web sunucusu PATCHDOCK [286] kullanılarak gerçekleştirildi. Reseptör proteini (AGO proteininin A zinciri) ile mikroRNA ve AGO proteininin A zinciri ile mikroRNA-mRNA kompleksi arasındaki moleküler yerleştirme gerçekleştirildi. PATCHDOCK yazılımı, en iyi çözümü oluşturmak için etkileşimlerin şekil tamamlayıcılığı esasına göre çalışmaktadır [286]. Atomik konumların ortalama kare kök sapması (RMSD) veya ortalama kare kök sapması üst üste binen proteinlerin atomları arasındaki ortalama mesafenin ölçüsü, protein-küçük ligand kompleks tipi seçilerek; 2.0 °A olacak şekilde ayarlanmıştır. MikroRNA'lar, mikroRNA-mRNA'lar ve AGO'nun yapılarının tümü PDB dosya formatına dönüştürülerek; PATCHDOCK web sunucusuna girdi olarak kullanıldı. En yüksek puana sahip yapı en iyi kompleks olarak kabul edildi. [286].

4.2.5.1. miRNA'lar ve AGO Proteini Arasındaki Moleküler Yerleştirme Analizi

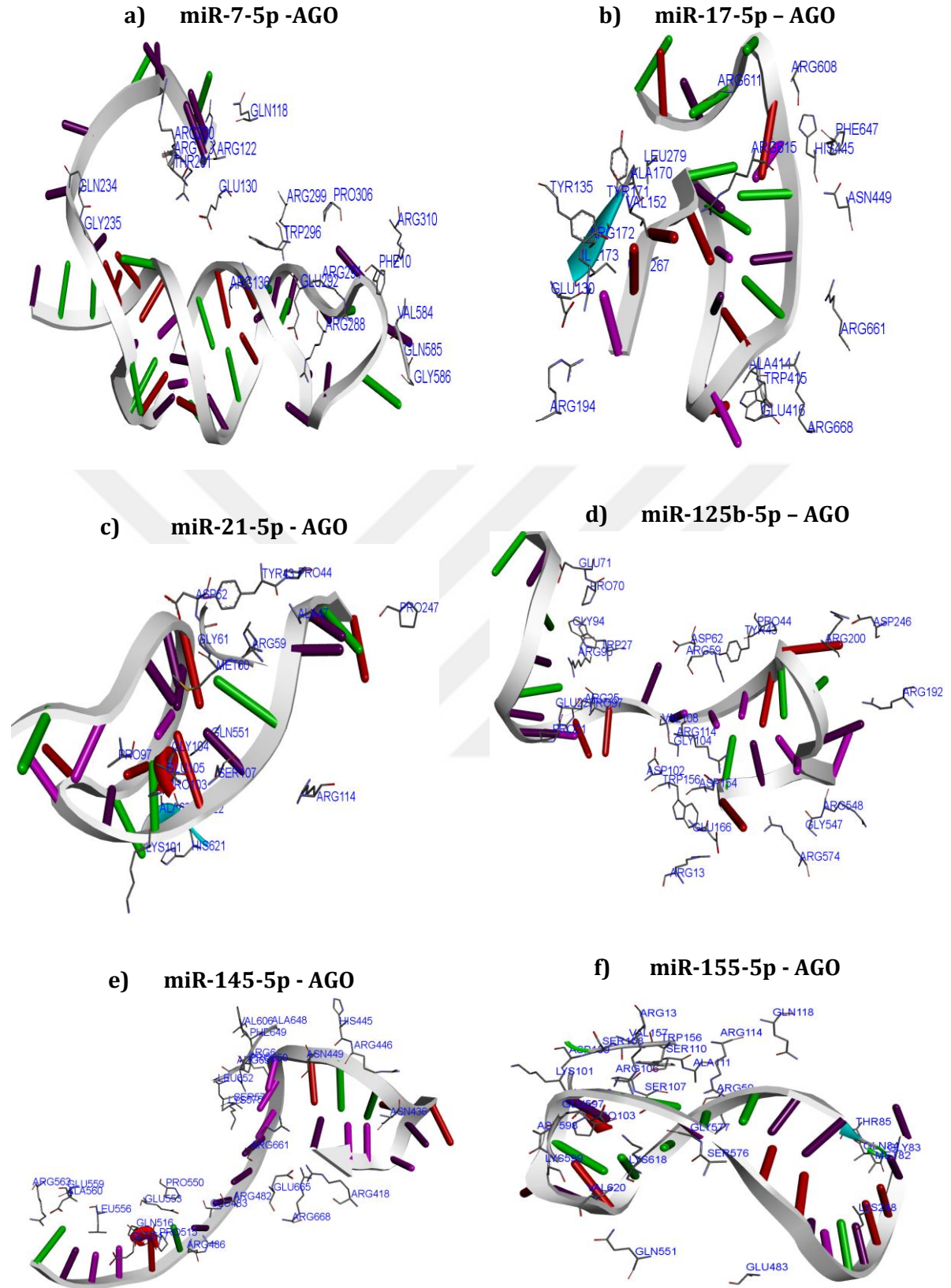
miRNA'ların argonaut protein ile moleküler yerleştirme analizi yapılarak; sonuç dosyaları, geometrik şekil tamamlayıcılık puanlarına göre sıralandı. (Tablo 4.4)

Tablo 4.4. miRNA ve AGO proteini arasındaki yerleştirme puanları.

miR - AGO (PDB ID:3F73, chain A)	Puan	Area	ACE
miR-7-5p - AGO	19652	3743,6	-1272,64
miR-17-5p - AGO	15852	2523,5	-817,38
miR-21-5p - AGO	15444	2437	-452,56
miR-125b-5p - AGO	18222	2499,8	-784,25
miR-145-5p - AGO	17532	2813,2	-983,36
miR-155-5p - AGO	18534	2750,2	-653,11
miR-206 - AGO	14692	2368,1	-752,1
miR-221-3p - AGO	16370	1830,1	-387,72
miR-222-3p - AGO	17180	3547,5	-1664,01
miR-223-3p - AGO	16898	2406,7	-739,65

Puan, her bir miRNA ve AGO kompleksi için oluşturulan geometrik şekil tamamlayıcı puanını gösterir. ACE, atomik temas enerjisidir.

Moleküler yerleştirme sonuçları miRNA'lar ile AGO proteinin 3,5 °A mesafeye kadar etkileşime katılan hidrofobik ve aromatik amino asit kalıntıları ile H-bağları incelendi. Bu etkileşimler görselleştirildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. miRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteininin amino asit kalıntıları (3,5 °Å mesafedeki)



Tablo 4.5. miRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları (3,5 °A mesafedeki)

miRNA	Hidrofobik AA	Aromatik AA	H-Bağı
miR-7-5p	(17 ^a) THR201, GLY235, PRO306, VAL584, GLY586	(4 ^b) PHE10, TRP296	GLN118, THR201, GLN234, GLY235, ARG287, ARG288, ARG291, SER295, ARG299, PRO306, VAL584, GLY586
miR-17-5p	(25 ^a) VAL152, ALA170, ILE173, LEU267, LEU279, ALA414	(4 ^b) TRY135, TYR171, TRP415, PHE647	TRY171, ARG172, ILE173, ARG194, ASN449, ARG615
miR-21-5p	(17 ^a) ALA47, MET60, GLY61, GLY 104, SER107, ALA623, GLY624	(2 ^b) TYR43	ARG28, ASP62, LYS101, GLY104, SER107, PRO247, LYS248, TYR568, GLY624
miR-125b-5p	(30 ^a) PRO21, PRO44, PRO70, GLY94, PRO97, GLY104, VAL108, GLY 547, GLY 577	(3 ^b) TRP27, TYR43, TRP156	ARG25, ARG28, TYR43, ARG59, ASP62, GLU71, GLY94, ARG95, ARG114, ARG192, GLU203, ASP246, GLY547, LYS618
miR-145-5p	(17 ^a) PRO515, PRO550, LEU556, ALA560, SER576, VAL606, ALA648, PRO650, LEU652	(2 ^b) PHE649	ARG418, ASN436, GLU443, ASN449, GLN516, GLU517, ARG563, LYS575, PRO650, ARG651, ARG661, ARG668, VAL685
miR-155-5p	(25 ^a) MET82, GLY83, THR85, PRO103, SER107, SER 110, ALA11, VAL157, SER158, SER576, GLY577, VAL620	(1 ^b) TRP156	ARG59, GLY83, THR85, PRO100, PRO103, SER107, SER110, ARG114, GLN118, ASP154, VAL157, ASP159, LYS248, GLU483, GLN551, GLY577, GLU597, ASP598
miR-206	(15 ^a) LEU267, SER276, LEU277, ALA278, GLY481, ALA648, GLY667	(1 ^b) PHE647	LYS91, SER276, LEU277, ASN436, GLU443, GLY481, ARG548, ARG661
miR-221-3p	(21 ^a) PRO188, THR201, PRO247, VAL264, THR266, ALA479, VAL663, GLY667	(3 ^b) TYR43, TRP415	TYR43, LEU189, LYS191, ARG192, ASP246, PRO247, VAL264, THR266, TRP415, ASP478, ARG482, ARG651, ASP660, ARG661, ARG668

Tablo 4.5 miRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları (3,5 °A mesafedeki) (devamı)

miRNA	Hidrofobik AA	Aromatik AA	H-Bağı
miR-222-3p	(41 ^a) PRO169, ALA170, THR201, LEU201, LEU267, LEU277, SER280, THR410, ILE434, LEU435, ALA450, VAL606, GLY612, THR613, PRO614, PRO650	(6 ^b) TYR135, TYR171	TYR171, ARG418, ASN419, LEU435, ASN436, GLU443, HIS445, ARG446, ASN449, ARG482, ARG611, THR613, ARG615, ARG651
miR-223-3p	(32 ^a) ILE173, THR201, VAL264, LEU265, THR266, LEU267, LEU277, LEU279, SER280, GLY481, SER484, THR613, PRO614, GLY646, ALA648	(4 ^b) TYR171, TRP415, TRP447, PHE647	TYR171, ARG172, LYS191, ARG192, THR266, LEU267, GLU268, LEU277, SER280, LYS329, LEU435, ASN436, GLU441, ARG444, HIS445, ARG446, GLU448, GLY481, ARG482, SER484, ARG486, ARG580, ARG611, ARG615, GLY646, ALA648, ARG661

^a Reseptör ve miRNA'lar arasındaki etkileşimde yer alan toplam hidrofobik amino asit kalıntısı sayısı

^b Reseptör ve miRNA'lar arasındaki etkileşimde yer alan toplam aromatik amino asit sayısı.

4.2.5.2. AGO Proteini ve miRNA-mRNA Kompleksleri Arasındaki Yerleştirme Analizi

miRNA'ların AGO proteini ile moleküler yerleştirme analizine benzer şekilde, miRNA'lar ve bunların hedef genleri arasındaki miRNA-mRNA kompleksleri AGO proteini ile moleküler yerleştirme uygulaması yapıldı ve hidrofobik, aromatik amino asit kalıntıları ve hidrojen bağı açısından olası bağlanma etkileşimi incelendi. Geometrik puanlama analizine dayalı olarak, komplekslerin her biri için en yüksek puan Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6. miRNA ve hedefleri ile AGO proteini arasındaki yerleştirme puanları

miR_mRNA - AGO (PDB ID:3F73, chain A)	Puan	Area	ACE
miR-7-5p_AKT3 - AGO	17370	2919,2	-999,43
miR-7-5p_PI3KR3 - AGO	15816	2262,8	-496,7
miR-7-5p_PIK3CB - AGO	16298	3338,9	-1019,64
miR-7-5p_PIK3CD - AGO	18136	3492,4	-551,31
miR-17-5p_AKT3 - AGO	16750	3705	-1408,63
miR-17-5p_PI3KR1 - AGO	19196	3138,2	-535,57
miR-21-5p_PI3KR1 (861-867) - AGO	19956	3022,9	-895,5
miR-21-5p_PI3KR1 (1107-1113) - AGO	15106	2995,7	-1275,05
miR-125b-5p_PIK3C2B - AGO	18180	4114	-1387,23
miR-145-5p_AKT3 - AGO	15998	2267,5	-202,76
miR-155-5p_PI3KR1 - AGO	15958	2264	-861,29
miR-155-5p_PIK3CA - AGO	19146	4401,3	-1356,24

Tablo 4.6 miRNA ve hedefleri ile AGO proteini arasındaki yerleştirme puanları (devamı)

miR_mRNA - AGO (PDB ID:3F73, chain A)	Puan	Area	ACE
miR-206_PIK3C2A - AGO	17638	2735,5	-1064,3
miR-221-3p_PI3KR1(522-529) - AGO	17450	2536,2	-570,87
miR-221-3p_PI3KR1(2854-2860) - AGO	19604	3306,4	-1319,18
miR-222-3p_PI3KR1(522-529) - AGO	17200	2101,9	-251,37
miR-222-3p_PI3KR1(2854-2860) - AGO	18084	2716	-1097,3
miR-223-3p_PIK3C2A - AGO	17700	2458,3	-788,91

Puan, her bir miRNA ve AGO kompleksi için oluşturulan geometrik şekil tamamlayıcı puanını gösterir. ACE, atomik temas enerjisidir.

miRNA-mRNA'lar ile argonaute proteinin 3,5 °A mesafeye kadar etkileşime katılan hidrofobik ve aromatik amino asit kalıntıları ile H-bağları incelendi. Moleküler yerleştirme sonuçları Tablo 4.7'de sunulmuştur.

Tablo 4.7. miRNA-mRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları (3,5 °A mesafedeki)

miRNA	Hidrofobik AA	Aromatik AA	H-Bağı
miR-7-5p_AKT3 - AGO	(19 ^a) ALA170, ILE173, THR266, LEU267, SER276, LEU277, ALA278, LEU279, SER 280, GLY612, THR613, PRO614, ALA648, VAL685	(3 ^b) PHE647, PHE649	SER276, LEU277, LEU279, SER280, LEU281, ARG418, HIS445, ASN449, ARG608, ARG611, THR613, ARG615, ARG661, ARG668
miR-7-5p_PIK3R3 - AGO	(22 ^a) LEU267, SER276, GLY488, ALA508, SER645, ALA648, PRO650, GLY667	(5 ^b) TRP415, PHE487, TYR642, PHE647	LEU267, SER276, LEU277, SER280, ASN419, GLU443, ARG 444, HIS445, ARG446, ASN449, ARG 15, TYR642, SER645, PHE647, ARG651, LEU652, GLY667, ARG668
miR-7-5p_PIK3CB - AGO	(20 ^a) GLY54, GLY55, VAL56, SER68, PRO69, LEU116, LEU124, PRO218, LEU221, SER229, GLY231	(5 ^b)TYR197, TYR226	GLY55, SER68, GLU71, LEU116, ARG120, ARG122, TYR197, TYR226, LYS230, ARG236
miR-7-5p_PIK3CD - AGO	(12 ^a) SER276, SER280, PRO282, GLY612, ALA648	(4 ^b) TRP283, TRP415, PHE647	SER276, SER280, GLU284, HIS445, ASN449, ARG611, PHE647, ARG661, ARG668

Tablo 4.7 miRNA-mRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları (3,5 °A mesafedeki) (devamı)

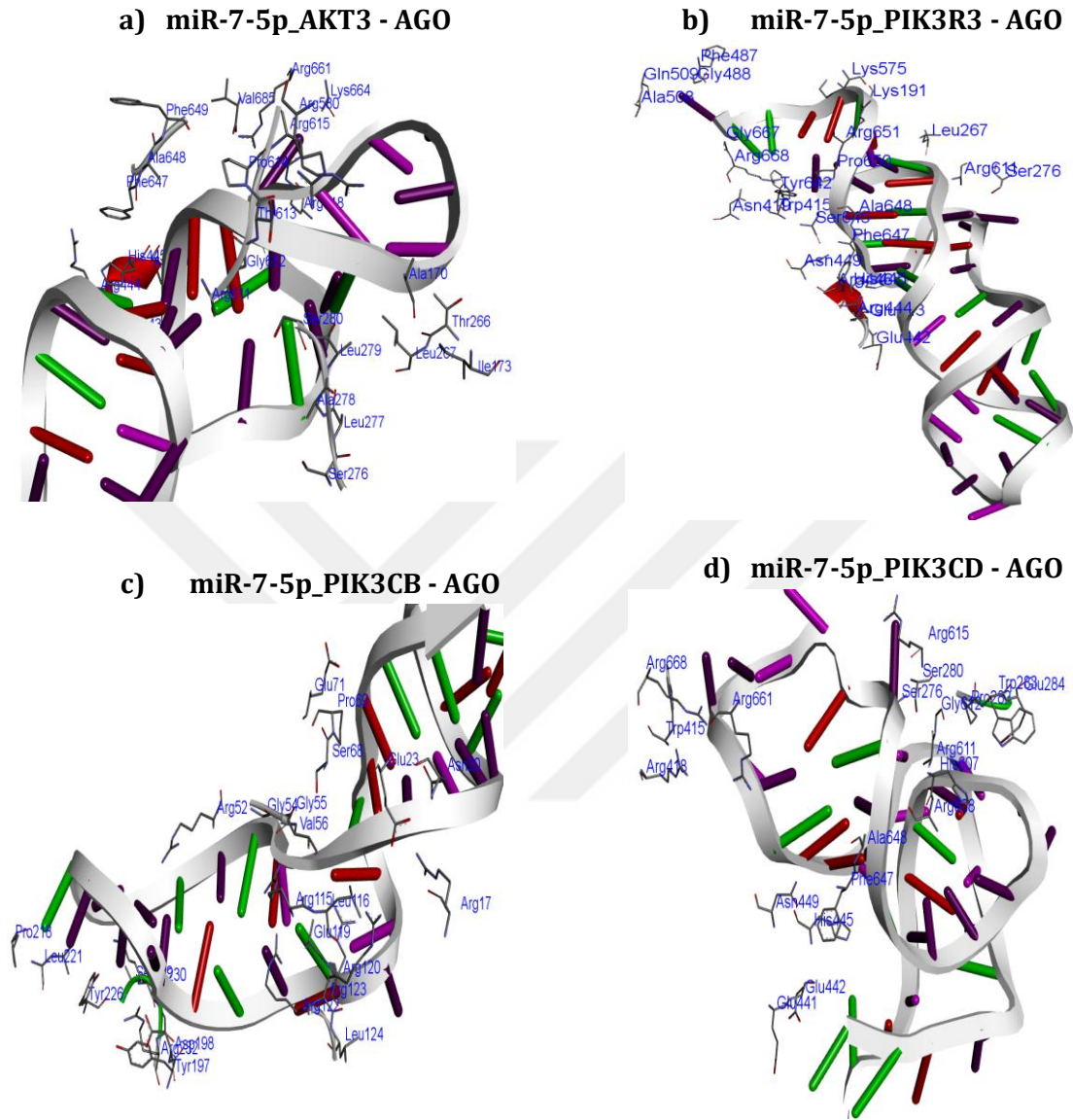
miRNA	Hidrofobik AA	Aromatik AA	H-Bağı
miR-17-5p_AKT3 - AGO	(21 ^a) ALA170, ILE173, VAL264, THR266, LEU26, ALA278, LEU279, SER280, LEU281, PRO650	(4 ^b) TYR171, PHE649	TYR171, ILE173, ARG194, SER276, GLU284, GLU285, ARG288, PHE649, ARG651
miR-17-5p_PI3KR1 - AGO	(23 ^a) PRO21, PRO44, ALA47, ALA53, GLY54, GLY55, PRO69, VAL72, VAL74, GLY126, GLY131, ALA196, GLY231, GLY235	(5 ^b) TRP27, TYR197	ASN20, ARG51, GLY55, VAL74, ARG115, GLN118, ARG122, ARG123, GLU130, GLN234, GLY235, ARG136
miR-21-5p_PI3KR1(861-867) - AGO	(23 ^a) LEU267, LEU277, SER280, LEU281, PRO438, GLY481, GLY612, THR613, SER645, PRO650	(4 ^b) TYR642	ASP168, ASN436, GLU442, ARG444, HIS445, ASN449, GLY481, ARG548, LYS575, ARG580, THR613, ARG651, HIS657, ARG661, ARG668
miR-21-5p_PI3KR1 (1107-1113) - AGO	(8 ^a) GLY402, VAL403, GLY429, LEU430, LEU505, ALA508, ALA529, VAL677	(2 ^b) TRP520, TRP528	GLN342, GLU343, ARG377, GLU400, GLY402, ARG513, TRP520, GLU676, ASP678, ARG679
miR-125b_PIK3C2B - AGO	(21 ^a) LEU267, LEU270, PRO412, MET413, PRO438, SER576, SER645, PRO650, VAL663, GLY667, VAL685	(3 ^b) TRP415, TYR642	TRP415, ASN419, ASN436, PRO438, GLU443, HIS445, ARG446, ASN449, TYR642, SER645, ARG651, ARG668, VAL685
miR-145-5p_AKT3 - AGO	(20 ^a) LEU277, ALA278, SER280, VAL327, SER328, ALA648	(4 ^b) TRP415, PHE647	ARG192, GLU203, SER276, LEU277, LEU279, SER280, LYS320, LEU329, ARG444, ARG651, ARG668
miR-155-5p_PI3KR1 - AGO	(22 ^a) ILE173, THR201, VAL264, LEU265, THR266, LEU267, LEU270, GLY275, SER276, LEU277, ALA278, LEU279, SER280, PRO282, ALA648	(5 ^b) TRP415, PHE647	ILE173, LYS191, ARG192, LEU267, GLU268, LEU270, SER276, LEU277, ALA278, LEU279, SER280, TRP415, ARG482, ARG608

Tablo 4.7. miRNA-mRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan amino asit kalıntıları (3,5 °A mesafedeki) (devamı)

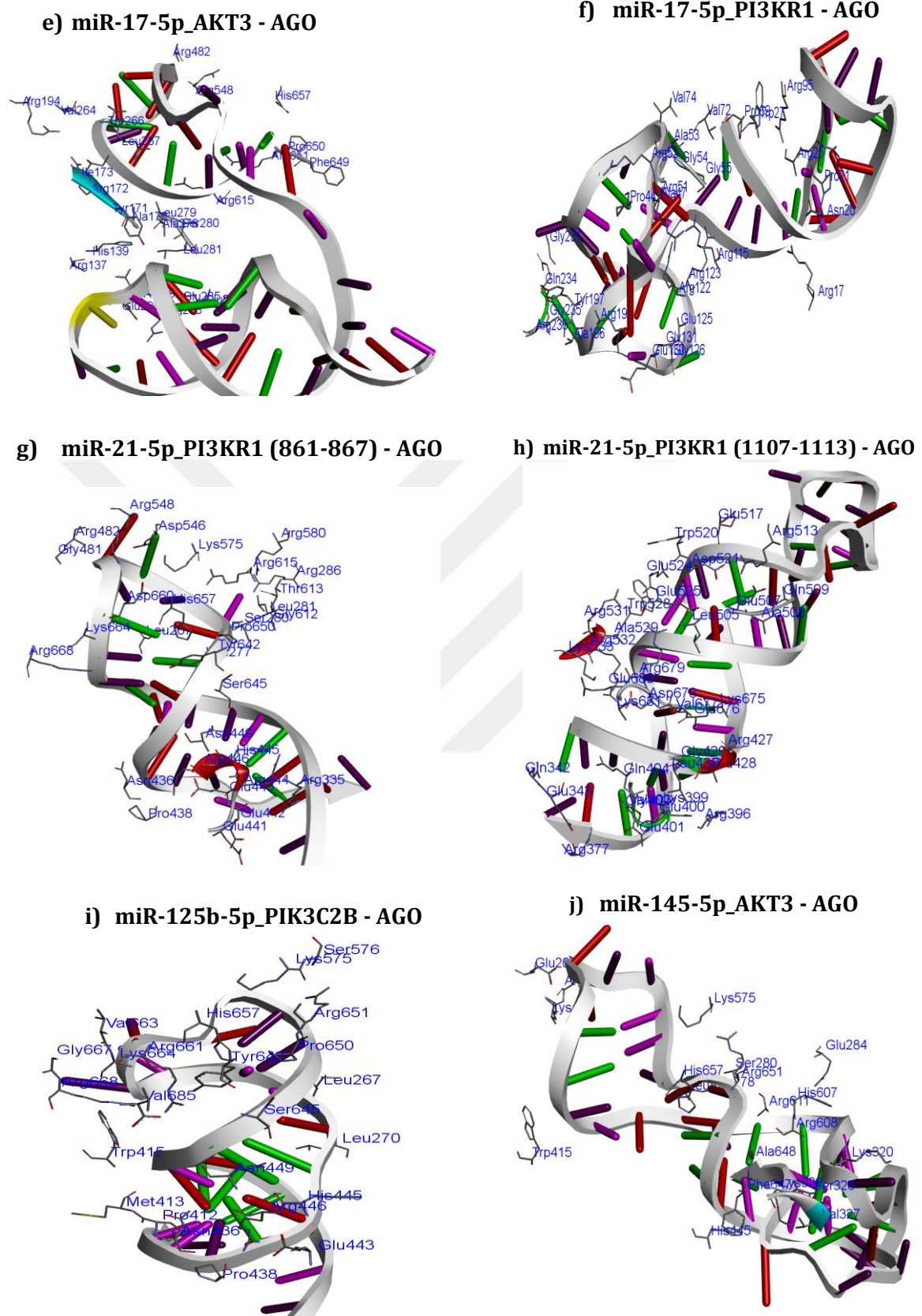
miRNA	Hidrofobik AA	Aromatik AA	H-Bağı
miR-155_PIK3CA - AGO	(17 ^a) GLY131, LEU132, VAL152, LEU267	(5 ^b) TRP415, PHE487	ALA47, ARG51, ARG114, GLU130, LEU132, TYR135, ARG172, ARG200, ARG418, ASN436, ARG608, ARG611, ARG615, ARG668
miR-206_PIK3C2A - AGO	(16 ^a) PRO44, ALA80, SER107, LEU124, GLY142, PRO143, GLY144, ALA196, GLY235	(6 ^b) TRP128, TRP202	ARG51, ARG52, ALA80, MET82, SER107, ARG122, GLY126, GLY142, GLY144, ARG146, GLN185, ASN195, ARG200, ARG574
miR-221-3p_PIK3R1(522-529) - AGO	(35 ^a) ALA111, GLY131, LEU132, ALA170, ILE173, THR201, VAL264, LEU265, THR266, LEU267, LEU277, LEU279, SER280, SER576, THR613, PRO650	(5 ^b) TYR171	ARG51, ARG59, SER107, LEU132, TYR171, ILE173, ARG192, LEU267, LEU277, ASN436, HIS445, ARG574, LYS575, ARG615, ARG651, ASP660
miR-221-3p_PIK3R1 (2854-2860) - AGO	(27 ^a) PRO44, ALA47, MET60, GLY61, SER107, GLY131, LEU132, ALA133, PRO550, SER576, VAL620	(4 ^b) TYR43, TYR135	ARG28, ALA47, ARG51, ARG59, ASP62, SER107, ARG114, GLN118, GLY131, LEU132, ALA133, TYR135, ARG545, ARG548, GLN551, ASP552, LYS575, ARG615
miR-222-3p_PIK3R1(522-529) - AGO	(17 ^a) PRO247, PRO250, THR266, LEU267, LEU270, PRO412, MET413, ALA414, PRO438, GLY667	(2 ^b) TRP415, PHE487	LYS191, ARG192, GLU203, PRO247, LEU267, TRP415, ASN436, ARG446, GLN516, ARG548, LYS575, GLY667, ARG668
miR-222-3p_PIK3R1 (2854-2860) - AGO	(20 ^a) GLY131, LEU131, LEU189, LEU207, GLY208, LEU265, THR266, ALA423, GLY667, LEU669	(1 ^b) TRP415	ARG51, ARG59, ARG114, GLN118, LEU132, GLY208, GLU209, ASN419, ARG482, GLY667, ARG672, HIS673, LYS675
miR-223-3p_PIK3C2A - AGO	(16 ^a) PRO70, VAL72, LEU75, THR78, THR85, LEU90, PRO92, GLY94, GLY131	(5 ^b) TRP27, TYR43, TYR91	ASP34, TYR43, ARG51, ARG52, ARG59, GLU71, GLU76, THR78, ARG89, TYR91, LYS93, GLY94, ARG95, GLN118, ARG199, ARG232

^a Reseptör ve miRNA-mRNA dubleksleri arasındaki etkileşimde yer alan toplam hidrofobik amino asit kalıntısı sayısı, ^b Reseptör ve miRNA-mRNA dubleksleri arasındaki etkileşimde yer alan toplam aromatik amino asit sayısı.

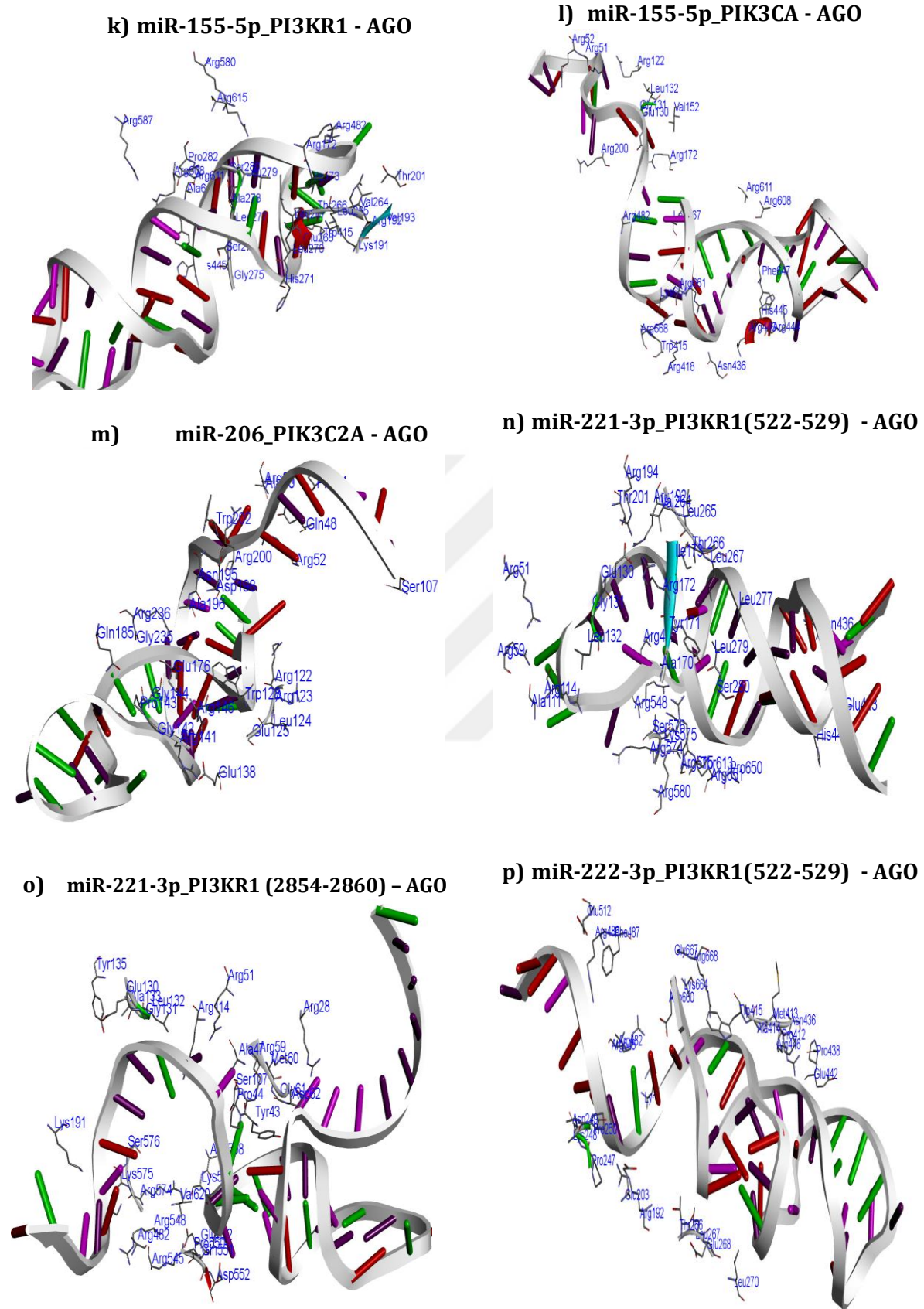
miRNA-mRNA'lar ile AGO proteininin 3,5 °A mesafeye kadar etkileşime katılan hidrofobik ve aromatik amino asit kalıntıları Şekil 4.5' deki gibi görselleştirildi.



Şekil 4.5. miRNA-mRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteininin amino asit kalıntıları (3,5 °A mesafedeki)

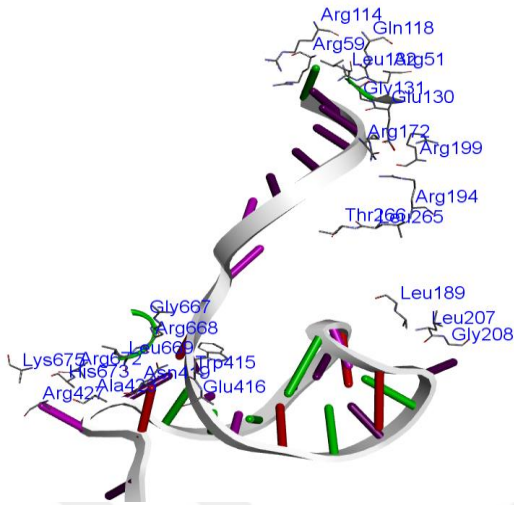


Şekil 4.5. miRNA-mRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteininin amino asit kalıntıları (3,5 Å mesafedeki) (devamı)

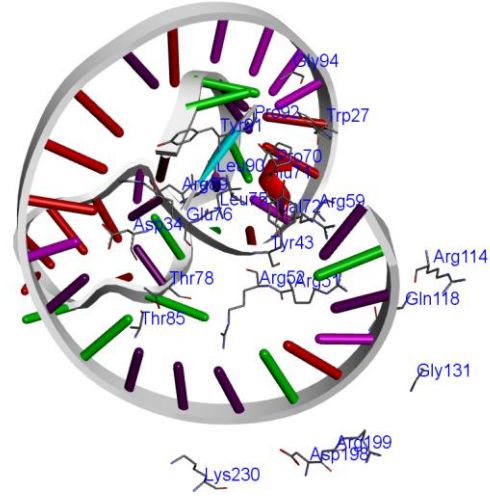


Şekil 4.5. miRNA-mRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteininin amino asit kalıntıları (3,5 Å mesafedeki) (devamı)

q) miR-222-3p_PI3KR1 (2854-2860) - AGO



r) miR-223_PIK3C2A - AGO

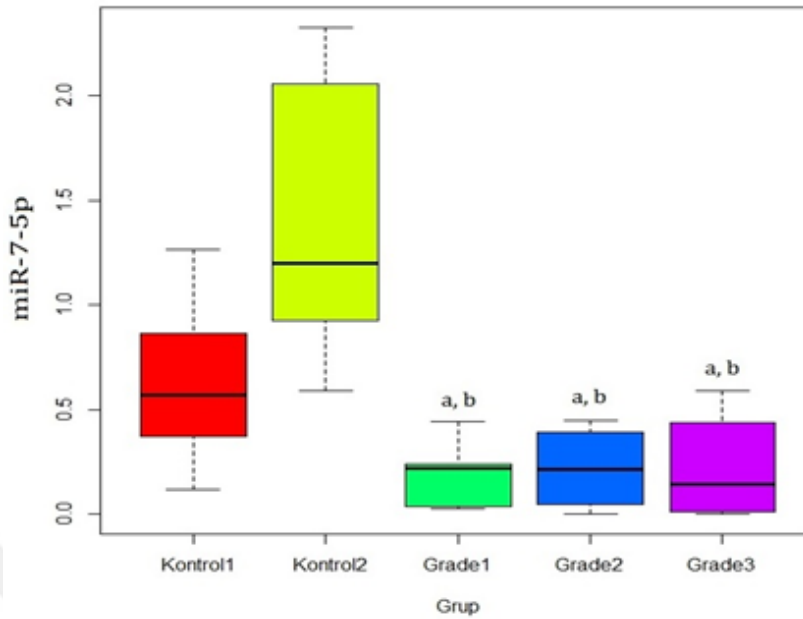


Şekil 4.5. miRNA-mRNA'lar ile etkileşime katılan AGO proteininin amino asit kalıntıları (3,5 Å mesafedeki) (devamı)

4.3. miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.3.1. miR-7-5p Ekspresyon Düzeyi

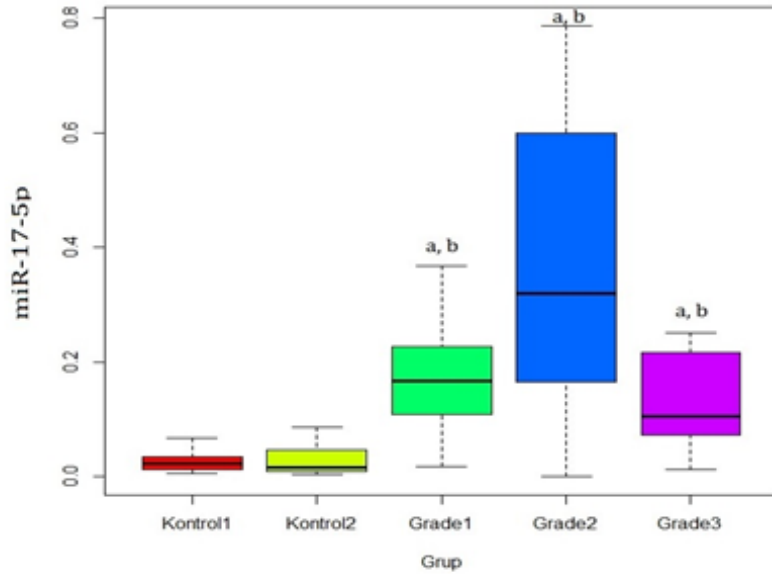
miR-7-5p ekspresyon düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında; Grade-1, Grade-2 ve Grade-3; Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. miR-7-5p ekspresyon düzeyi gruplar arasında Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,0098$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,013$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$), Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,00808$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır. ($p>0,05$).



Şekil 4.6. miR-7-5p ekspresyon düzeyleri. a; Kontrol-1 Grubu, b; Kontrol-2 Grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) farklılık göstermektedir.

4.3.2. miR-17-5p Ekspresyon Düzeyi

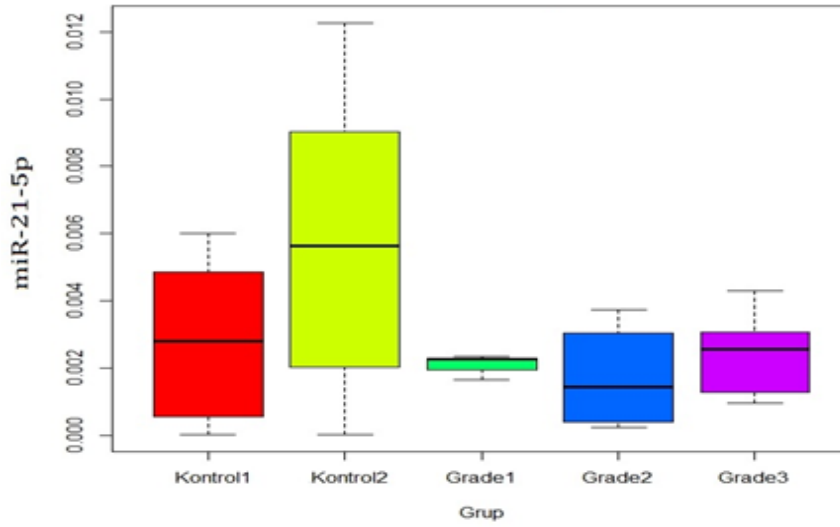
miR-17-5p ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; Grade-1, Grade-2 ve Grade-3; Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,00262$) ve Kontrol-2 ($p=0,00237$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p<0,001$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,0061$) ve Kontrol-2 ($p=0,00551$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.7. miR-17-5p ekspresyon düzeyleri. a; Kontrol-1 Grubu, b; Kontrol-2 Grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) farklılık göstermektedir.

4.3.3. miR-21-5p Ekspresyon Düzeyi

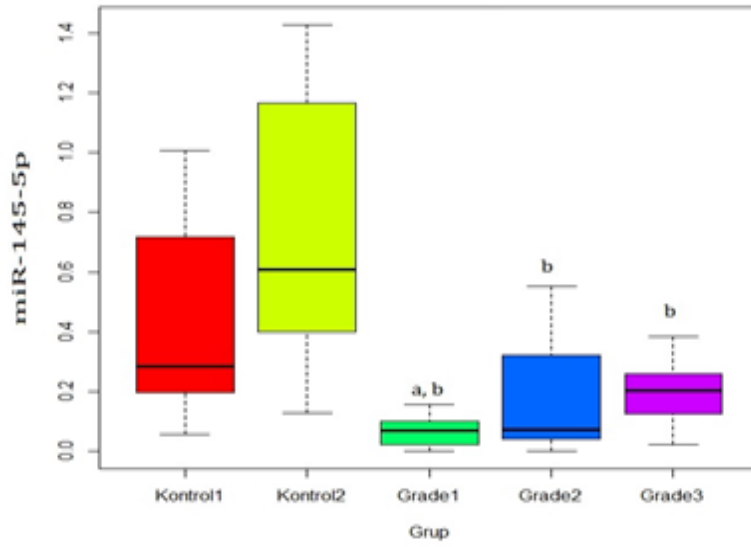
miR-21-5p ekspresyon düzeyi Kontrol ve Hasta Grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. miR-21-5p ekspresyon düzeyi Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,9973$) ve Kontrol-2 ($p=0,9900$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,3168$) ve Kontrol-2 ($p=0,2927$), Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,9965$) ve Kontrol-2 ($p=0,5731$) arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p > 0,05$). Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.8. miR-21-5p ekspresyon düzeyleri.

4.3.4. miR-145-5p Ekspresyon Düzeyi

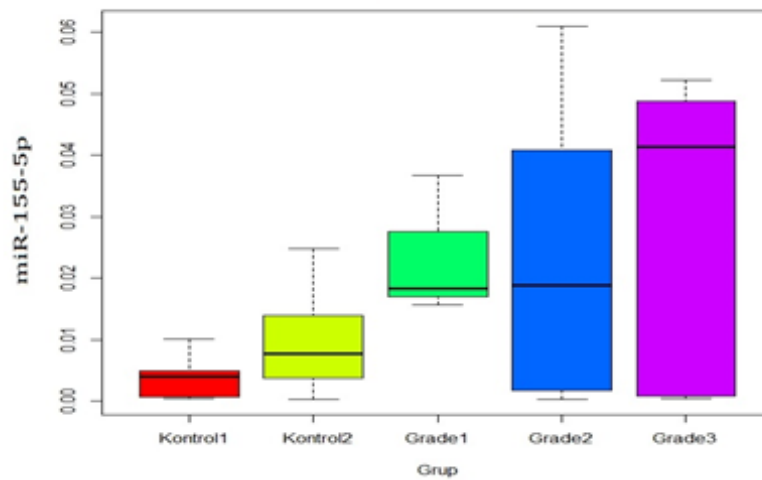
miR-145-5p ekspresyon düzeyi Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,00414$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-2 ($p=0,00378$), Grade-3 ile Kontrol-2 ($p=0,01272$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,07912$) ve Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,21051$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. miR-145-5p ekspresyon düzeyi Grade-1 grubunda; Kontrol-1 (sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) göre, Grade-2 ve Grade-3 gruplarında; Kontrol-2 (proliferatif faz) grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.9. miR-145-5p ekspresyon düzeyleri. a; Kontrol-1 Grubu, b; Kontrol-2 Grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) farklılık göstermektedir.

4.3.5. miR-155-5p Ekspresyon Düzeyi

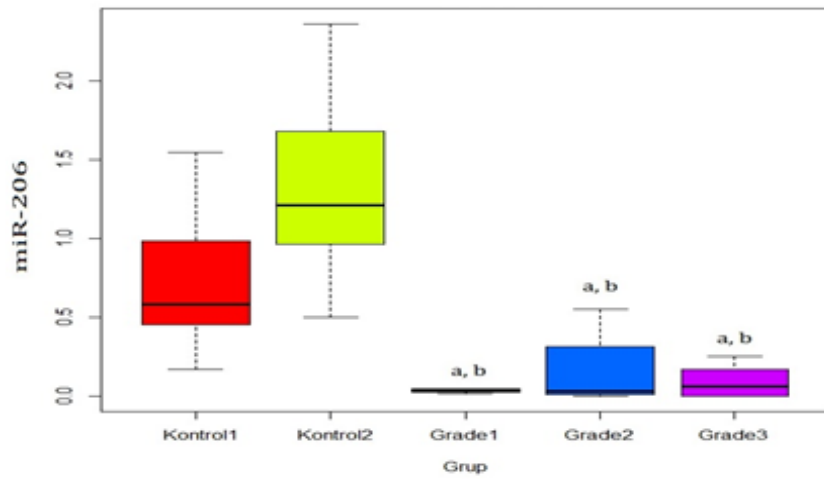
miR-155-5p ekspresyon seviyesi Kontrol ve Hasta Grupları arasında; istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. miR-155-5p ekspresyon düzey Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,0895$) ve Kontrol-2 ($p=0,6209$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,3453$) ve Kontrol-2 ($p=0,1141$), Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,1538$) ve Kontrol-2 ($p=0,10409$) arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.10. miR-155-5p ekspresyon düzeyleri.

4.3.6. miR-206 Ekspresyon Düzeyi

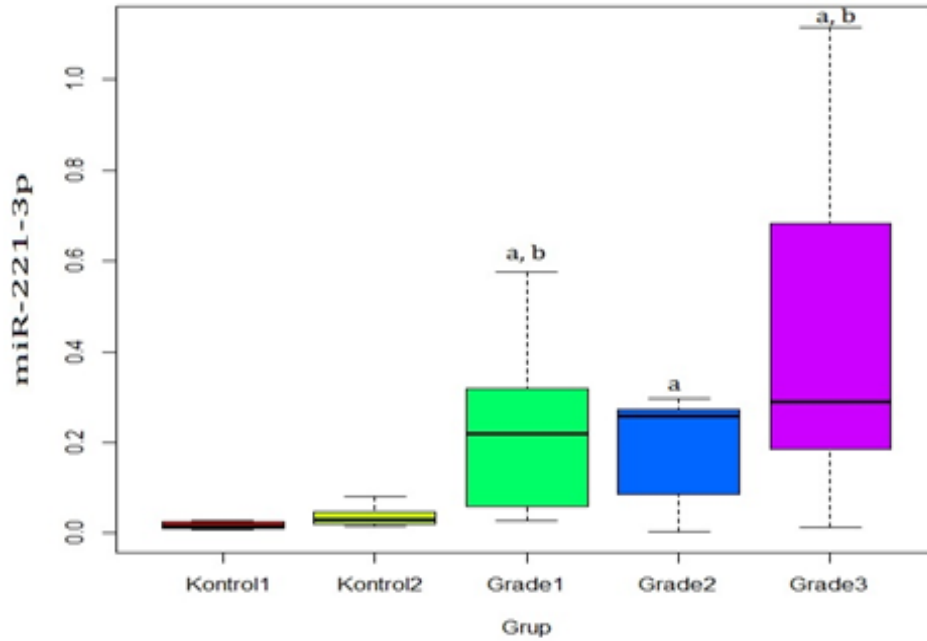
miR-206 ekspresyon düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında; Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,00995$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,01128$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,00144$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. miR-206 ekspresyon seviyesi Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 hasta gruplarında Kontrol-1(sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.11. miR-206 ekspresyon düzeyleri. a; Kontrol-1 Grubu, b; Kontrol-2 Grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) farklılık göstermektedir.

4.3.7. miR-221-3p Ekspresyon Düzeyi

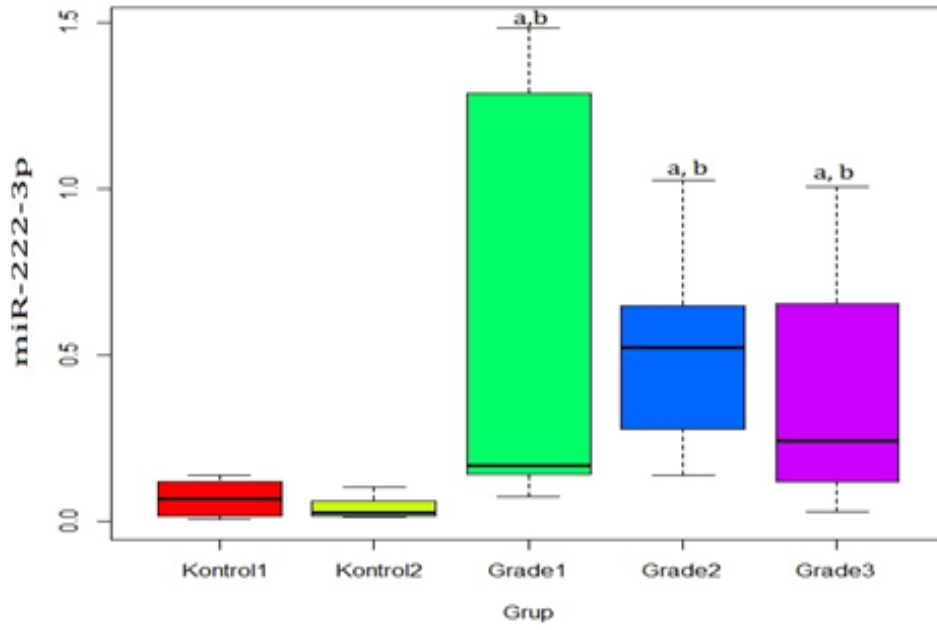
miR-221-3p ekspresyon düzeyi Grade-1 ile Kontrol-1 ($p<0,001$) ve Kontrol-2 ($p=0,02224$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,00753$), Grade-3 ile Kontrol-1 ($p<0,001$) ve Kontrol-2 ($p=0,00491$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. Grade-2 ile Kontrol-2 ($p=0,18157$) arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır. miR-221-3p ekspresyon düzeyi Grade-1 ve Grade-3 gruplarında; Kontrol-1(sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) gruplarına göre, Grade-2 grubunda; Kontrol-1 (sekretuar faz) grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.12. miR-221-3p ekspresyon düzeyleri. a; Kontrol-1 Grubu, b; Kontrol-2 Grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) farklılık göstermektedir.

4.3.8. miR-222-3p Ekspresyon Düzeyi

miR-222-3p ekspresyon düzeyi Grade-1 ile Kontrol-1 ($p < 0,001$) ve Kontrol-2 ($p < 0,001$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p < 0,001$) ve Kontrol-2 ($p < 0,001$), Grade-3 ile Kontrol-1 ($p = 0,00321$) ve Kontrol-2 ($p < 0,001$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. miR-222-3p ekspresyon düzeyi Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 hasta gruplarında; Kontrol-1 (sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Şekil 4.13. miR-222-3p ekspresyon düzeyleri. a; Kontrol-1 Grubu, b; Kontrol-2 Grubu ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) farklılık göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Endometrial kanser; serviks kanserinden sonra kadın üreme sisteminin en sık görülen malignitesidir [287]. Endometrial kanser Tip-I (östrojene bağımlı) ve Tip-II (östrojen bağımsız) olarak iki kategoriye ayrılmaktadır [2]. Genel olarak vakaların yaklaşık %75'i Tip-I'dir, erken teşhis edilir ve iyi prognoza sahiptir. Tip-II endometrium kanseri düşük sağ aklım oranı (5yıl) ve metastaz eğilimi ile karakterizedir [3]. Endometrial kanser gelişimine sebep olan birçok risk faktörü bulunmasına rağmen, karşılanmamış östrojen en önemli nedendir [4]. Moleküler düzeyde bakıldığında Tip-I endometrial kanserde PTEN kaybı, PIK3CA ve KRAS mutasyonları görülürken; Tip-II endometrial kanserde p53 mutasyonları, HER-2 aşırı ekspresyonu görülmektedir [288].

Birçok kanser tipinin patogenezinde PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının düzensizliği rol oynamaktadır. Sistemik insülin ve endometrial IGF-1'in yüksek seviyelerinin endometrial kanser prognozunu kötüleştirdiği gösterilmiştir [170]. İnsülin ve IGF-1 reseptörlerinin aşırı ekspresyonunda PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı aktivasyonu yoluyla endometrial hiperplazi ve Tip-1 endometrial kanser gelişimine yol açtığı bildirilmiştir [172]. Birçok kanser türünde PTEN'in PI3K/AKT/mTOR yolunu negatif düzenleyerek; tümör baskılayıcı bir protein olduğu gösterilmiştir. PTEN ekspresyonun zayıflaması; PI3K/AKT/mTOR yolunun aktivasyonuna yol açan, bunun sonucu olarak endometrial tümör oluşumu ve invaziv büyümesini sağlayan kilit bir mekanizmadır [173]. PTEN'deki bu ekspresyon kaybının nedeni mutasyon, heterozigosite kaybı ve promotör hipermetilasyonu gibi çeşitli mekanizmalar olabilir [46]. Tip I endometrial kanserin %57-83'ünde [46], Tip II endometrial kanserlerde ise %10'a varan oranlarda [49] PTEN mutasyonları meydana gelmektedir. PI3K'nın aktivasyonu, aşağı akış yollarını aktive eden ikinci haberci olan PIP3'ü üretir. PIP3 aracılığıyla aşağı akış yollarının aktive olması apoptozun baskılanmasını ve hücre proliferasyonunun artmasına neden olmaktadır [2]. PI3K'nın p110 α katalitik alt birimi (PIK3CA) mutasyonları tüm endometrial kanser vakalarının %24-36'sında meydana gelmektedir. PIK3CA'daki bu mutasyonların %14-26'sı PTEN mutasyonları ile birlikte bulunur [48]. Tip I endometrial kanserlerin %50 üzeri ve Tip II endometrial kanserlerin de %30'unda PIK3CA mutasyonu bulunmaktadır [49]. Endometrial kanserde PI3K'nın düzenleyici alt birimi olan p85a'yı kodlayan PIK3R1'deki mutasyonlara bağlı olarak da PI3K/AKT/mTOR yolu aktive olabilmektedir. PIK3R1, endometrioid karsinomların %43'ü, non-endometrioid karsinomların ise %12'sinde mutasyona uğrar [289]. Endometrial karsinomda AKT3 (E438D) mutasyonları PIK3CA'da amplifikasyon ve mutasyonla birlikte görülebilir. AKT3, endometrial kanserde de hücre proliferasyonu ve apoptozun düzenlenmesinde de rol oynar [290].

Gen ifadesinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesinde fonksiyon gösteren, yaklaşık 23 nükleotit uzunluğunda, küçük kodlanmayan RNA molekülleri miRNA olarak adlandırılmaktadır [6]. miRNA'lar, hedef geninin mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak, gen ekspresyonunun baskılanması veya engellenmesine neden olmaktadır [7]. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi ya da tam olarak bağlanabilirler. Eğer tam bir bağlanma gerçekleşirse hedef mRNA'ları degrade eder, kısmi bağlanma olursa hedef mRNA translasyonel olarak baskılanmış olur [8]. Bu özellikleri miRNA'ları potansiyel farmakolojik hedefler haline getirmektedir. Bir miRNA birden fazla geni hedef alabilir veya bir mRNA birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilir [9]. miRNA'ların pek çok hastalıkla ilişki olup, kanser gelişimi ve ilerlemesinde rol oynayabildiği bilinmektedir. Klinik uygulamalarda miRNA'ların potansiyel rolü erken teşhis ve tümörlerin sınıflandırılması, hayatta kalma ve tedaviye yanıt tahminini içermektedir. Ayrıca miRNA'lar kanser ile ilişkili moleküllerin ekspresyonun kapsamlı olarak düzenlenmesi ile bir tedavi aracı olarak da kullanılabilir. miRNA'ların aşırı eksprese edildiği durumlarda oligonükleotid miRNA inhibitörleri veya miRNA süngerler, tersine miRNA'ların aşağı regüle edildiği durumda ise eksikliği düzeltmek için miRNA replasman tedavisi uygulanabilir [9].

MikroRNA'lar insan tümörlerinde PI3K/AKT/mTOR yolundaki bir çok anahtar bileşeni hedeflemektedir. Karaciğer kanserinde miR-21, miR-216a ve miR-217, prostat kanserinde miR-26a ve miR-92a, nazofarenks kanserinde miR-205, osteosarkom tümöründe miR-17 PTEN kaybına neden olur [173–175]. Benzer şekilde akciğer ve karaciğer kanserlerinde miR-221 ve miR-222 PTEN'i hedefleyerek; AKT ekspresyonunu artırır [176]. MiR-375 kolorektal kanserde tümör supresör rol oynayarak; PI3KCA'nın ekspresyonunun aşağı regülasyonu yoluyla hücre büyümesini inhibe etmektedir [180]. PI3K'ün p85 alt birimini etkileyen miR-155 ve miR-126 aşırı ekspresyonu tümör hücresinin büyümesini baskılar. Akciğer kanseri hücresinde regüle edilen MiR-1, PI3KCA'yı hedefler ve p-AKT seviyelerini düşürerek; kanser hücresi proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu baskılamaktadır [181]. Benzer şekilde karaciğer kanser hücrelerinde miR-7 PI3KCD'ı baskılar. miR-125b tiroid kanserinde PI3KCD'ı hedefleyerek; PI3K, p-AKT ve p-mTOR ekspresyonlarını azaltmaktadır [182]. miR-7, miR-99a, miR-100, miR-101, miR-206, miR-223 bir çok tümör hücresinde mTOR'u düzenlemektedir [175, 219, 252]. miR-145 küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde aşağı regüle edilerek; mTOR ekspresyonunu arttırmakta, bu durum da tümör oluşumu ve büyümesine neden olmaktadır [238].

miRNA'lar endometrial büyüme ve farklılaşmada görev almaktadır. Normal dokulardaki miRNA'ların ekspresyon modelleri kanserli dokularla aynı değildir. miRNA ekspresyonlarındaki farklılaşma kanser oluşumuna neden olmaktadır [291]. Endometrial kanserde yukarı regüle

olan miR-103, miR-106a, miR-107, miR-181a, miR-185, miR-205, miR-210, miR-423, miR-429, miR-449 ve let-7c tümör oluşumu, invazyon ve metastaza katılmaktadır. İnvazyon ve metastazı inhibe eden miR-30c, miR-152, miR-99b, miR-193, miR-193b, miR-204, let-7e ise aşağı regüle edilmektedir [277, 294, 295].

Bu çalışma kapsamında endometrial kanser teşhisi konmuş hastalarda PI3K/AKT/mTOR yoluna etki eden miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p, miR-222-3p ekspresyon seviyelerini belirleyerek; moleküler hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutmak amaçlanmıştır. PI3K/AKT/mTOR yoluna etki eden miRNA'lar kapsamlı literatür araştırması ile belirlenerek; çevrimiçi veritabanları kullanılarak doğrulanmıştır. TargetScan veri tabanı araştırması sonucunda miR-7-5p'nin; PIK3CD 3' UTR (268-275 pozisyonu), PIK3R3 3' UTR (2935-2942 pozisyonu), PIK3CB 3' UTR (778-784 pozisyonu) ve AKT3 3' UTR (3880-3886 pozisyonu); miR-17-5p'nin; PIK3R1 3' UTR (1331-1337 pozisyonu) ve AKT3 3' UTR (1142-1148 pozisyonu), miR-21-5p'nin; PIK3R1 3' UTR (861-867 pozisyonu) ve PIK3R1 3' UTR (1107-1113 pozisyonu), miR-125b-5p; PIK3C2B 3' UTR(753-759 pozisyonu), miR-145-5p; AKT3 3' UTR (5492-5499 pozisyonu), miR-155-5p; PIK3CA 3' UTR(106-112 pozisyonu) ve PIK3R1 3'UTR (3718-3724 pozisyonu), hsa-miR-206; PIK3C2A 3'UTR (854-860 Pozisyonu), miR-221-3p; PIK3R1 3' UTR (522-529 pozisyonu) ve PIK3R1 3' UTR (2854-2860 pozisyonu), miR-222-3p; PIK3R1 3'UTR (522-529 pozisyonu) ve PIK3R1 3'UTR (2854-2860 pozisyonu), hsa-miR-223-3p; PIK3C2A 3' UTR (1644-1651 pozisyonu) hedeflediği belirlenmiştir.

Gen ekspresyon çalışmaları yapılmadan önce in siliko analizlerle miRNA ve hedefleri arasındaki etkileşimler incelenmiştir. RNA susturma işlemi, hedef mRNA'nın tamamlayıcı dizisini tanımak için küçük RNA'yı şablon olarak kullanan bir ribonükleoprotein kompleksi olan RISC varlığını gerektirir [294]. RNA bağlayıcı proteinler, miRNA ve RNA interferans gibi RNA susturma işlemlerinde görev almaktadır. Bu ailenin benzersiz bir üyesi olan AGO [295] insanlarda RISC'in fonksiyonel çekirdeğini oluşturur. AGO ile kompleksleşen RISC, translasyonel baskı veya bozulma yoluyla hedef tanıma ve susturma için kılavuz olarak mikroRNA gibi küçük molekülleri kullanır [296]. Yapısal olarak, AGO proteini, N-terminali, PAZ, MID ve PIWI alanlarından oluşur [297]. Spesifik olarak, PAZ alanı miRNA'nın 3' ucuna bağlanırken; 5' ucu MID alanına bağlanır [298]. MikroRNA bağlayıcı proteinler, mikroRNA'ların deregülasyonuna dahil olmaları nedeniyle kanser araştırmalarında bir odak noktası haline gelmiştir [301, 302]. miRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölge (Untranslated Region-UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (Open Reading Frame) bölgesine bağlanır. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ifade eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. miRNA'lar hedef mRNA'ya kısmi ya da tam olarak bağlanabilirler. Eğer tam bir bağlanma gerçekleşirse hedef mRNA'ları degrade eder, kısmi

bağlanma olursa hedef mRNA translasyonel olarak baskılanmış olur. AGO, hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası susturma mekanizmalarında sekansa özgü kılavuzlar olarak mikroRNA'ları ve RNA interferansını kullanır [301]. AGO proteini RNA susturmada önemli bir rol oynadığından, AGO ile miRNA ve mRNA arasındaki moleküler etkileşimi anlamak önemlidir. Bu moleküllerin stabilitesini değerlendirmek için in silico olarak; bu moleküller moleküler yerleştirme simülasyonu yoluyla modellenenebilir. Moleküler simülasyon, biyolojik ve kimyasal moleküllerin dinamik davranışının tanımlanmasından bağlama analizine kadar pek çok teorik çalışmada verimli ve uygun maliyetli bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, ilaç ve tedavilerin daha da geliştirilmesi için etkileşimin in silico bakış açısına dayalı olarak AGO proteini ile ekspresyon düzeyleri belirlenecek miRNA'lar ve hedeflerinin mRNA dubleksleri arasında moleküler simülasyonlar yapılmıştır.

miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki katlanma afinitesini doğrulamak için RNAfold web sunucusu kullanılarak ikincil yapılar tahmin edilmiştir. RNA'ların minimum serbest enerjisi (MFE), dizi uzunluğu ile lineer oranda artar. MFE'nin nükleotid sayısına bölünmesiyle elde edilen basit indeksler, çeşitli boyutlardaki RNA'ların katlanma stabilitesinin doğrudan karşılaştırılması için kullanılabilir. Minimum serbest enerji(MFE) ne kadar küçük ise yapı o kadar olasıdır [302]. miRNA'lar ve hedeflerinin oluşturabileceği dublekslerin MFE'si miRNA ve hedefin 3'UTR sinin MFE'sinden daha küçüktür. Sadece miR-7-5p ve AKT-3, PIK3CB ve PIK3CD'nin oluşturacağı dublekslerin MFE'si miR-7-5p mFE'sinden büyüktür. Fakat miR-7-5p'nin PIK3R3 ile oluşturacağı dubleks yapısının MFE'si miR-7-5p'nin MFE'sinden küçüktür (Tablo 4.3). Bu veriler miRNA ve hedeflerinin tahmin edilen dubleksleri oluşabileceğini göstermektedir.

Oluşturulan iki boyutlu yapıların dot bracket nokta yapılarından da faydalanılarak; RNACOMPOSER web sunucusu yardımıyla her bir miRNA ve hedef mRNA'nın 3'UTR bölgesinin oluşturduğu üç boyutlu yapı modellemesi yapılmıştır. miRNA'ların AGO protein ile moleküler yerleştirme analizi yapılarak; sonuç dosyaları, geometrik şekil tamamlayıcılık puanlarına göre sıralanmıştır [286]. miRNA'lar ile AGO proteini arasındaki etkileşimde yer alan amino asit kalıntıları gözlemlendi. miRNA'lar ve reseptör molekül arasındaki etkileşime katılan 3,5 Å mesafedeki güçlü hidrofobik amino asitlerin (mir-7-5p:17; mir-17-5p:25; mir-21-5p:17; mir-125b-5p:30, miR-145-5p:17, miR-155-5p:25, miR-206:15, miR-221-3p:21, miR-222-3p:41 ve mir-223-3p:32) ve aromatik yan zincirli amino asitlerin (mir-7-5p:4; mir-17-5p:4; mir-21-5p:2; mir-125b-5p:3, miR-145-5p:2, miR-155-5p:1, miR-206:1, miR-221-3p:3, miR-222-3p:6 ve mir-223-3p:4) ayrıca 2.0 Å mesafedeki hidrojen bağları, argonaut proteini yoluyla gen düzenlemesinin mikroRNA'lar tarafından yönlendirildiğini desteklemektedir. Hidrojen bağları (H-bağları), ligand bağlanmasının özgüllüğünü belirleyen önemli bir etkileşimdir. Onların

önemli katkıları, moleküllerin reseptörlerine enerjik olarak uygun bir şekilde bağlanmasını arttırmaktadır. Protein-ligand etkileşimleri için hidrojen bağları bazı önemli roller oynamaktadır. Bu roller, bağlanma molekülünün oryantasyonunu, ligand tanımayı ve bağlanma afinitesini içermektedir [303]. 2.0 Å mesafedeki hidrojen bağı sayısı AGO reseptörü ile miR-7-5p arasında 12, miR-17-5p arasında 6, miR-21-5p arasında 9, miR-125b-5p arasında 14, miR-145-5p arasında 13, miR-155-5p arasında 18, miR-206 arasında 8, miR-221-3p arasında 15, miR-222-3p arasında 14 ve miR-223-3p arasında 27'dir. Uygun etkileşimlerin sayısı ne kadar yüksek olursa, hidrojen bağlarının sayısı o kadar fazladır. Bu sonuçlar ilgili mikroRNA'ların RISC yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen mekanizmayı destekleyebileceğini göstermektedir.

miRNA'ların AGO proteine kenetlenme analizine benzer şekilde, aday miRNA'lar ve bunların hedef genleri arasındaki miRNA-mRNA kompleksleri de ayrıca AGO proteinine karşı kenetlendi ve hidrofobiklik, aromatik kalıntı amino asitler ve hidrojen bağı açısından olası bağlanma etkileşimleri incelendi. Moleküler yerleştirme, AGO proteini (zincir A) ve çalışılacak miRNA'ların her biri ile ayrı ayrı PATCHDOCK'ta gerçekleştirilmiştir. Geometrik puanlama analizine dayalı olarak, komplekslerin her biri için en yüksek puan tablo 4.6 'da verilmiştir. 3,5 Å mesafedeki güçlü hidrofobik amino asit sayısı miR-7-5p_AKT3 - AGO arasında 19, miR-7-5p_PIK3R3 - AGO arasında 20, miR-7-5p_PIK3CB - AGO arasında 20, miR-7-5p_PIK3CD - AGO arasında 12, miR-17-5p_AKT3 - AGO arasında 21, miR-17-5p_PI3KR1 - AGO arasında 23, miR-21-5p_PI3KR1 (861-867) - AGO arasında 21, miR-21-5p_PI3KR1 (1107-1113) - AGO arasında 8, miR-125b-5p_PIK3C2B - AGO arasında 21, miR-145-5p_AKT3 - AGO arasında 20, miR-155-5p_PIK3CA - AGO arasında 17, miR-206_PIK3C2A - AGO arasında 16, miR-221-3p_PI3KR1(522-529) - AGO arasında 35, miR-221-3p_PI3KR1 (2854-2860) - AGO arasında 27, miR-222-3p_PI3KR1(522-529) - AGO arasında 17, miR-222-3p_PI3KR1 (2854-2860) - AGO arasında 20 ve miR-223-3p_PIK3C2A - AGO arasında 16'dır. 3,5 Å mesafedeki aromatik yan zincirli amino asit sayısı en fazla (5 etkileşim) miR-7-5p_PIK3R3 - AGO arasındaki etkileşimde gözlenmiştir. İncelenen moleküler yerleştirmeler arasında yapıya kararlılık sağlayacak kadar H-bağı bulunmakla birlikte 2.0 Å mesafedeki hidrojen bağı sayısı en fazla (18 hidrojen bağı) miR-7-5p_PIK3R3 - AGO arasında bulunmaktadır. Doğada, aromatik yan zincirlere sahip amino asitlerle birlikte güçlü hidrofobik amino asitler reseptör ve ligand arasındaki stabilite önemlidir. miRNA-mRNA kompleksleri ile AGO arasındaki yeterli sayıda hidrofobik ve aromatik yan zincirli amino asit etkileşimi ayrıca yapıya kararlılık sağlayacak H-bağları içermektedir. İn siliko analizler çalışılacak miRNA'lar ve belirlenen olası hedefler arasındaki etkileşimi göstermiştir.

Gen ekspresyonu çalışmalarında miR-7-5p ekspresyon düzeyinin gruplar arasında karşılaştırıldığında; Hasta Grupları Grade-1, Grade-2 ve Grade-3; Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamı derecede azaldığı tespit

edilmiştir. Hasta Grupları Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Bu çalışma ile uyumlu olarak akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada da akciğer kanserinde miR-7-5p ekspresyonunun azaldığı ve in siliko analizlerimizde tespit ettiğimiz gibi PIK3R3'ü hedeflediği bildirilmiştir [224]. Benzer şekilde hepatosellüler karsinomda yapılan bir çalışmada miR-7'nin aşağı regüle edildiği ve PIK3CD'yi hedeflediği belirlenmiştir [214]. Melanom[225] ve mide kanseri [226,227] üzerine yapılan çalışmalarda da ilgili kanserlerde miR-7 ekspresyonunun azaldığı ve PI3K/AKT/mTOR yolakını etkilediği tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuç daha önce farklı miR-7'nin farklı kanserlerde yapılan çalışmalarda olduğu gibi PI3K/AKT/mTOR'u hedeflediğini ve ekspresyonunun azaldığı sonucu ile uyumludur.

Laringeal skuamöz hücreli karsinomda yapılan çalışmalarda miR-17-5p ekspresyon seviyesinin yukarı regüle edildiği tespit edilmiştir. İn vitro deneylerle miR-17-5p düzeyinin anti-miR uygulayarak azaltılmasıyla; AKT fosforilasyonunu bastırdığı, ancak PTEN ekspresyonunu etkilenmediği, lusiferaz raportör testine göre PIK3R1 ekspresyonunu pozitif olarak düzenlediği deneysel olarak gösterilmiştir [192]. Prostat kanseri [228] ve osteosarkomda[175] da miR-17 ekspresyon düzeyinin arttığı bildirilmiştir. İlgili çalışmalar miR-17'nin PTEN'i hedeflediğini tespit etmiştir. Hepatosellüler karsinomda yapılan bir çalışma da miR-17'nin yukarı regüle edildiği ve AKT'yi hedeflediği bildirilmiştir [229]. Yaptığımız in siliko analizlerde de literatürle uyumlu olarak miR-17-5p'nin PIK3R1 ve AKT3'ü hedefleyebileceği tespit edilmiştir. Endometrial kanserde miR-17-5p ekspresyon seviyesini belirlemek için yaptığımız deneysel çalışma sonucunda miR-17-5p ekspresyon düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında; Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,00262$) ve Kontrol-2 ($p=0,00237$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p<0,001$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$), Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,0061$) ve Kontrol-2 ($p=0,00551$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. miR-17-5p ekspresyon seviyesi Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 hasta gruplarında Kontrol-1(sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Bu çalışmada in siliko analizlerle miR-21-5p'in PIK3R1'i hedeflediği belirlenmiştir. Endometrial kanser için yapılan deneysel çalışmada miR-21-5p ekspresyon düzeyi Kontrol ve Hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Hasta Grupları Grade-1, Grade-2 ve Grade-3, Kontrol Grupları Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı bir fark yoktur. Birçok kanserde miR-21 aşırı eksprese edilmektedir. Yapılan bir çalışmada miR-21'in, normal akciğer dokularına göre akciğer

adenokarsinom dokularında önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve bu yüksek ekspresyonun kötü hasta prognozu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada miR-21-5p hedef geni olarak PIK3R1 belirlenmiştir [235]. miR-21-5p'nin PIK3R1'i hedeflemesi in siliko analiz sonucumuzla uyumludur. Mesane kanseri [231] ve hepatosellüler karsinomda [232] yapılan çalışmalarda miR-21'in yukarı regüle edildiği, PTEN ve AKT'yi hedeflediği belirlenmiştir. miR-21'in böbrek kanserinde de yukarı regüle edildiği ve AKT ve mTORC1 ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir [233].

Endometrial kanserde miR-145-5p ekspresyon seviyesini belirlemek için yaptığımız deneysel çalışmada Kontrol ve Hasta Grupları arasında Grade-1 ile Kontrol-1 ve Kontrol-2 arasında, Grade-2 ve Grade-3 ile Kontrol-2 arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. miR-145-5p ekspresyon düzeyi Grade-1 grubunda; Kontrol-1(sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) göre, Grade-2 ve Grade-3 gruplarında; Kontrol-2 (proliferatif faz) grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır. İn siliko analizde literatürde daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak miR-145-5p'nin AKT3'ü hedeflediği tespit edilmiştir. MiR-145 küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde mTOR'u [238] ve EGFR/PI3K/AKT [239] yolunu hedefler ve aşağı regüle edilir. Mesane kanseri [204] ve laringeal skuamöz hücreli karsinomda [240] da ekspresyon düzeyi azalan miR-145 PI3K/AKT yolunu hedeflemektedir. Tiroid kanserinde miR-145 ekspresyonu önemli ölçüde aşağı regüle edilir ve doğrudan AKT3'ü hedef alır [241]. miR-145 ile yaptığımız gen ekspresyon çalışmaları ve in siliko analiz sonuçları literatür ile uyumdur.

miR-155 pek çok kanserde yukarı regüle edilmektedir. Ekspresyon seviyesi artan miR-155 kronik miyeloid lösemi [242] ve meme kanserinde [243] mTOR'u ve osteosarkomda [244] PTEN'i hedeflemektedir. Hepatosellüler karsinom(HCC) ve diffüz büyük B hücreli lenfomada (DLBCL) miR-155'in aşırı ekspresyonu, PIK3R1'nin translasyonunu aşağı regüle eder. Yaptığımız in siliko analizde de önceki çalışmalarla uyumlu olarak; miR-155-5p'in PIK3CA ve PIK3R1'i hedeflediği tespit edilmiştir. Ancak gen ekspresyon çalışmalarında endometrial kanserde miR-155-5p ekspresyon seviyesinde Kontrol ve Hasta Grupları arasında; istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Bu çalışmada miR-206 ekspresyon düzeyi gruplar arasında karşılaştırıldığında Grade-1 ile Kontrol-1 ($p=0,00995$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında, Grade-2 ile Kontrol-1 ($p=0,01128$) ve Kontrol-2($p<0,001$) Grade-3 ile Kontrol-1 ($p=0,00144$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir. miR-206 ekspresyon seviyesi Grade-1, Grade-2 ve Grade-3

Hasta Gruplarında Kontrol-1 (sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) gruplarına göre anlamlı derecede azalmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Epitelyal ovarian kanser [247], baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu [248], küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [249], akciğer kanseri [250], özofagus skuamöz hücreli karsinomda [251] miR-206 ekspresyon düzeyi azalarak; PI3K/AKT/mTOR yolağına etki etmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuç endometrial kanserde miR-206 ekspresyon düzeyindeki azalma diğer kanser türlerinde yapılan çalışmalarla uyumludur. İn siliko analizlerimiz miR-206'nın PIK3C2A genini hedefleyebileceğini göstermektedir.

Bir çok kanserde olduğu gibi oral skuamöz hücreli karsinomda da miR-221 ifadesi yukarı regüle edilmektedir [193]. Benzer şekilde meme kanserinde [255] de ekspresyon seviyesi artan miR-221, PIK3R1 ifadesini hedefleyerek ve PI3K/AKT/mTOR yolağını etkilemektedir. Yaptığımız in siliko analizlerde daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak miR-221-3p'nin PIK3R1'i hedeflediği belirlenmiştir. Serviks kanseri [252], küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [176], hepatoselüler karsinom [253] ve osteosarkomda [254] miR-221'in ekspresyonu artmaktadır. Bu çalışmalarda olduğu gibi endometrial kanserde yaptığımız bu çalışmada da miR-221-3p ekspresyonu artmıştır. miR-221-3p ekspresyon düzeyi Grade-1 ve Grade-3 gruplarında; Kontrol-1(sekretuar faz) ve Kontrol-2 (proliferatif faz) göre, Grade-2 grubunda; Kontrol-1 (sekretuar faz) grubuna göre anlamlı derecede artmıştır. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Bu çalışmada endometrial kanserde miR-222-3p ekspresyon seviyesinin Grade-1 grubunda; Kontrol-1 ($p<0,001$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) gruplarına göre, Grade-2 grubunda; Kontrol-1 ($p<0,001$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) gruplarına göre, Grade-3 grubunda; Kontrol-1 ($p=0,00321$) ve Kontrol-2 ($p<0,001$) gruplarına göre anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Grade-1, Grade-2 ve Grade-3 arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca Kontrol-1 (Sekretuar faz) ve Kontrol-2 (Proliferatif faz) arasında da anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalar da mesane kanseri [231], küçük hücreli olmayan akciğer kanseri [176], hepatoselüler karsinom [256] ve nazofaringeal karsinomda [257] miR-222 ekspresyonunun arttığı ve PI3K/AKT/mTOR yolağını etkilediği bildirilmiştir.

Tiroid kanseri [198], serviks kanseri [236] ve ewing sarkomunda [237] aşağı regüle edilen miR-125b PIK3CD'yi hedeflemektedir. Yaptığımız in siliko analizde miR-125b-5p'nin PIK3C2B'yi hedeflediği belirlenmiştir. Hepatoselüler karsinom [217], servikal kanser [234] ve epitelyal yumurtalık kanserinde [258] yukarı regüle edilen miR-223 mTOR ve PTEN'i hedefleyerek; PI3K/AKT/mTOR yolağında düzensizliklere sebep olarak; kanser sürecinde yer

almaktadır. İn silico analizlerimiz miR-223-3p'ün PIK3C2A'yı hedeflediğini ortaya koymuştur. İn silico analiz sonuçları değerlendirildiğinde miR-125b-5p ve miR-223-3p'in hedefleri ile etkileşimlerinin zayıf olması nedeniyle ekspresyon düzeyleri analiz edilmemiştir.

5.2. Sonuç

Bu çalışmada PI3K/AKT/mTOR yolağını etkileyen miR-7-5p, miR-17-5p, miR-21-5p, miR-145-5p, miR-155-5p, miR-206, miR-221-3p ve miR-222-3p'nin endometrial kanserde in silico analizleri ve ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır.

İn silico analizlerle miR-7-5p'nin PIK3CD, PIK3R3, PIK3CB ve AKT3'ü, miR-17-5p'nin PIK3R1 ve AKT3'ü, miR-21-5p'nin PIK3R1'i, miR-125b-5p'nin PIK3C2B'i miR-145-5p'nin AKT3'ü, miR-155-5p'nin PIK3CA ve PIK3R1'i, miR-206'nın PIK3C2A'yı, miR-221-3p ve miR-222-3p'nin PIK3R1'i, miR-223-3p'nin PIK3C2A'yı hedefleyerek; PI3K/AKT/mTOR yoluna etki edebileceği belirlenmiştir.

Çalışmamızda endometrial kanserde miR-7-5p ve miR-206'nın ekspresyonları Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre tüm Hasta Gruplarında azalırken; miR-145-5p ekspresyonu Grade-1'de Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre, Grade-2 ve Grade-3'te Kontrol-2'ye göre azalmıştır. miR-17-5p ve miR-222-3p'nin ekspresyonlarının Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre Hasta Gruplarında arttığı, miR-221-3p ekspresyonunun Grade-1 ve Grade-3'te Kontrol-1 ve Kontrol-2'ye göre, Grade-2'de ise Kontrol 1'e göre arttığı tespit edildi. miR-21-5p ve miR-155-5p ekspresyon seviyesi belirlemek için istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu sonuçlar farklı kanserlerle yapılan çalışmalarla uyumludur. miR-21-5p ve miR-155-5p ekspresyonu için istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Literatürde farklı kanser türlerinde ilgili miRNA'ların bu hedefleri etkilediği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur.

Pek çok kanser türünde biyobelirteç olarak kullanılabilecek miRNA'lara yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada ekspresyonları belirlenen miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için endometrial kanser Tip-I ve Tip-II'deki farklılıklarının olup olmadığının da analiz edilmesine ihtiyaç vardır. Ekspresyon düzeyleri belirlenen bu miRNA'lar hücrel büyüme, proliferasyonu ve epidermal-mezankimal geçişi teşvik eden; PI3K/AKT/mTOR yolunun aktivasyonunu engelleyecek; moleküler hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutabilir. Bu konuda gelecekte çalışacak araştırmacılar bu çalışmada in silico olarak tespit edilen miRNA hedeflerini in vitro ve in vivo olarak doğrulaması yaparak; bu hedeflere yönelik miRNA'ları hedefleyen tedavi stratejileri geliştirebilirler. Bu çalışma elde edilen sonuçlara göre Hasta Grupları arasında anlamlı farklılık olmaması nedeniyle çalışılan miRNA'ların endometrial kanser tanısında kullanılabileceğini ancak prognoz takibinde etkin bir rol alamayacağını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Dong, P., Kaneuchi, M., Watari, H., Hamada, J., Sudo, S. and Ju, J. (2011) . MicroRNA-194 inhibits epithelial to mesenchymal transition of endometrial cancer cells by targeting oncogene BMI-1. *Molecular Cancer*, BioMed Central Ltd. 10, 99. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-99>
- [2] Prat, J., Gallardo, A., Cuatrecasas, M. and Catasús, L. (2007) . Endometrial carcinoma: Pathology and genetics. *Pathology*, 39, 72–87. <https://doi.org/10.1080/00313020601136153>
- [3] Singh, P., Smith, C.L., Cheetham, G., Dodd, T.J. and Davy, M.L.J. (2008) . Serous carcinoma of the uterus - Determination of HER-2/neu status using immunohistochemistry, chromogenic in situ hybridization, and quantitative polymerase chain reaction techniques: Its significance and clinical correlation. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18, 1344–51. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01181.x>
- [4] Parazzini, F., Vecchia, C. La, Bocciolone, L. and Franceschi, S. (1991) . The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 41(1), 1–16.
- [5] Wang, Y., Mikhailova, M., Bose, S., Pan, C., Ralph, W. and Ghosh, P.M. (2008) . Regulation of androgen receptor transcriptional activity by rapamycin in prostate cancer cell proliferation and survival. *Oncogene*, 27, 7106–17. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.318.Regulation>
- [6] Chen, Y., Fu, L.L., Wen, X., Liu, B., Huang, J., Wang, J.H. et al. (2014) . Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*, 19, 1177–89. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0999-7>
- [7] Bartel, D.P. (2009) . MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136, 215–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- [8] He, L. and Hannon, G.J. (2004) . MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5, 522–31. <https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- [9] Roberts, T.C. and Wood, M.J.A. (2013) . Therapeutic targeting of non-coding RNAs. Lindsay MA, and Griffiths-Jones S, editors. *Essays in Biochemistry*, 54, 127–45. <https://doi.org/10.1042/bse0540127>
- [10] Roberts, T.C. and Wood, M.J.A. (2013) . Therapeutic targeting of non-coding RNAs. *Essays in Biochemistry*, 54, 127–45. <https://doi.org/10.1042/BSE0540127>
- [11] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. et al. (2021) . Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [12] Amant, F., Moerman, P., Neven, P., Timmerman, D., Van Limbergen, E. and Vergote, I. (2005) . Endometrial cancer. *Lancet*, 366, 491–505. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67063-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67063-8)
- [13] Başara, B.B., Çağlar, İ.S., Aygün, A., Özdemir, T.A., Kulali, B., Uzun, S.B. et al. (2021) . Sağlık İstatistikçi 2019 [Internet]. T.C. Sağlık Bakanl. Sağlık Bilgi Sistemleri Genel Müdürlüğü.
- [14] Braun, M.M., Overbeek-Wager, E.A. and Grumbo, R.J. (2016) . Diagnosis and management of endometrial cancer. *American Family Physician*, 93, 468–74.
- [15] Engelsens, I.B., Akslen, L.A. and Salvesen, H.B. (2009) . Biologic markers in endometrial cancer treatment. *Apmis*, 117, 693–707. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02467.x>

- [16] Burke, W.M., Orr, J., Leitaio, M., Salom, E., Gehrig, P., Olawaiye, A.B. et al. (2014) . Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part i. Gynecologic Oncology, Elsevier Inc. 134, 385–92. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.05.018>
- [17] Kimura, T., Kamiura, S., Yamamoto, T., Seino-Noda, H., Ohira, H. and Saji, F. (2004) . Abnormal uterine bleeding and prognosis of endometrial cancer. International Journal of Gynecology and Obstetrics, 85, 145–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2003.12.001>
- [18] Bokhman, J. V. (1983) . Two Pathogenetic Types of Endometrial Carcinoma. Gynecologic Oncology, 15, 10–7.
- [19] Moore, K.N. and Nickles Fader, A. (2011) . Uterine papillary serous carcinoma. Clinical Obstetrics and Gynecology, 54, 278–91. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e318218c755>
- [20] Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F. and Zwahlen, M. (2008) . Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. The Lancet, 371, 569–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X)
- [21] Prakansamut, N., Sirayapiwat, P. and Triratanachai, S. (2014) . The percentages of endometrial hyperplasia and endometrial cancer among polycystic ovary syndrome (PCOS) patients presenting with abnormal menstrual pattern. Journal of the Medical Association of Thailand, 97, 159–64.
- [22] Schumer, S.T. and Cannistra, S.A. (2003) . Granulosa cell tumor of the ovary. Journal of Clinical Oncology, 21, 1180–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.019>
- [23] Roberts, H., Hickey, M. and Lethaby, A. (2014) . Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia: A Cochrane review summary. Maturitas, 77, 4–6. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.10.002>
- [24] Beral, V., Bull, D., Reeves, G. (2005) . Endometrial cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. Lancet, 365, 1543–51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66902-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66902-4)
- [25] Iqbal, J., Ginsburg, O.M., Wijeratne, T.D., Howell, A., Evans, G., Sestak, I. et al. (2012) . Endometrial cancer and venous thromboembolism in women under age 50 who take tamoxifen for prevention of breast cancer: A systematic review. Cancer Treatment Reviews, Elsevier Ltd. 38, 318–28. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.06.009>
- [26] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. (2011) . Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin, 61, 212–36. <https://doi.org/10.3322/caac.20121>. Available
- [27] Brinton, L.A., Berman, M.L., Mortel, R., Twiggs, L.B., Barrett, R.J., Wilbanks, G.D. et al. (1992) . Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: Results from a case-control study. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 167, 1317–25. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(11\)91709-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(11)91709-8)
- [28] Parazzini, F., Negri, E., La Vecchia, C., Benzi, G., Chiaffarino, F., Polatti, A. et al. (1998) . Role of reproductive factors on the risk of endometrial cancer. International Journal of Cancer, 76, 784–6. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980610\)76:6<784::AID-IJC2>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980610)76:6<784::AID-IJC2>3.0.CO;2-U)
- [29] Pillay, O.C., Te Fong, L.F.W., Crow, J.C., Benjamin, E., Mould, T., Atiomo, W. et al. (2006) . The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. Human Reproduction, 21, 924–9. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei420>
- [30] Giovannucci, E., Harlan, D.M., Archer, M.C., Bergenstal, R.M., Gapstur, S.M., Habel, L.A. et al. (2010) . Diabetes and cancer: A consensus report. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 60,

- 207–21. <https://doi.org/10.2337/dc10-0666>
- [31] Hendriks, Y.M.C., Wagner, A., Morreau, H., Menko, F., Stormorken, A., Quehenberger, F. et al. (2004) . Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: Impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology*, 127, 17–25. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.068>
- [32] Riegert-Johnson, D.L., Gleeson, F.C., Roberts, M., Tholen, K., Youngborg, L., Bullock, M. et al. (2010) . Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-8-6>
- [33] Lucenteforte, E., Talamini, R., Montella, M., Maso, L.D., Pelucchi, C., Franceschi, S. et al. (2009) . Family history of cancer and the risk of endometrial cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, 18, 95–9. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328305a0c9>
- [34] Liang, S.X., Pearl, M., Liang, S., Xiang, L., Jia, L., Yang, B. et al. (2011) . Personal history of breast cancer as a significant risk factor for endometrial serous carcinoma in women aged 55 years old or younger. *International Journal of Cancer*, 128, 763–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.25395>
- [35] Beiner, M.E., Finch, A., Rosen, B., Lubinski, J., Moller, P., Ghadirian, P. et al. (2007) . The risk of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations. A prospective study. *Gynecologic Oncology*, 104, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.08.004>
- [36] Bjørge, T., Engeland, A., Tretli, S. and Weiderpass, E. (2007) . Body size in relation to cancer of the uterine corpus in 1 million Norwegian women. *International Journal of Cancer*, 120, 378–83. <https://doi.org/10.1002/ijc.22260>
- [37] Tavassoli FA, D.P. (2003) . World Health Organization Classification of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press.
- [38] Malpica, A. (2016) . How to approach the many faces of endometrioid carcinoma. *Modern Pathology*, Nature Publishing Group. 29, S29–44. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.142>
- [39] Carcangiu, M.L. and Chambers, J.T. (1992) . Uterine papillary serous carcinoma: A study on 108 cases with emphasis on the prognostic significance of associated endometrioid carcinoma, absence of invasion, and concomitant ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 47, 298–305. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(92\)90130-B](https://doi.org/10.1016/0090-8258(92)90130-B)
- [40] Olawaiye, A.B. and Boruta, D.M. (2009) . Management of women with clear cell endometrial cancer. A Society of Gynecologic Oncology (SGO) review. *Gynecologic Oncology*, Elsevier Inc. 113, 277–83. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2009.02.003>
- [41] Bae, H.S., Kim, H., Kwon, S.Y., Kim, K.R., Song, J.Y. and Kim, I. (2015) . Should endometrial clear cell carcinoma be classified as type II endometrial carcinoma? *International Journal of Gynecological Pathology*, 34, 74–84. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000111>
- [42] Benedet, J.L., Bender, H., Jones, H., Ngan, H.Y. and Pecorelli, S. (2000) . FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 70, 209–62. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(00\)90001-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(00)90001-8)
- [43] Amant, F., Mirza, M.R., Koskas, M. and Creutzberg, C.L. (2018) . Cancer of the corpus uteri. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 143, 37–50. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12612>
- [44] Berek, J.S., Matias-Guiu, X., Creutzberg, C., Fotopoulou, C., Gaffney, D., Kehoe, S. et al.

- (2023) . FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 383–94. <https://doi.org/10.1002/ijgo.14923>
- [45] Getz, G., Gabriel, S.B., Cibulskis, K., Lander, E., Sivachenko, A., Sougnez, C. et al. (2013) . Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 497, 67–73. <https://doi.org/10.1038/nature12113>
- [46] Mutter, G.L., Lin, M., Fitzgerald, J.T., Jennifer, B., Baak, J.P. a, Jacqueline, a et al. (2000) . Altered PTEN Expression as. 92.
- [47] Larry Maxwell, G., Risinger, J.I., Gumbs, C., Shaw, H., Bentley, R.C., Barrett, J.C. et al. (1998) . Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias. *Cancer Research*, 58, 2500–3.
- [48] Oda, K., Stokoe, D., Taketani, Y. and McCormick, F. (2005) . High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. *Cancer Research*, 65, 10669–73. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2620>
- [49] Rudd, M.L., Price, J.C., Fogoros, S., Godwin, A.K., Sgroi, D.C., Merino, M.J. et al. (2011) . A Unique Spectrum of Somatic PIK3CA (p110 α) Mutations Within Primary Endometrial Carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 17, 1331–40. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0540>
- [50] Mary Ellen Urick, Meghan L. Rudd, Andrew K. Godwin, Dennis Sgroi, Maria Merino, and D.W.B. (2011) . PIK3R1 (p85- α /p85 α) is Somatic Mutated at High Frequency in Primary Endometrial Cancer. *Cancer Res*, 71, 4061–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0549.PIK3R1>
- [51] Dutt, A., Salvesen, H.B., Greulich, H., Sellers, W.R., Beroukhi, R. and Meyerson, M. (2009) . Somatic mutations are present in all members of the AKT family in endometrial carcinoma. *British Journal of Cancer*, Nature Publishing Group. 101, 1218–9. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605301>
- [52] Sideris, M., Emin, E.I., Abdullah, Z., Hanrahan, J., Stefatos, K.M., Sevas, V. et al. (2019) . The role of KRAS in endometrial cancer: A mini-review. *Anticancer Research*, 39, 533–40. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13145>
- [53] Matias-guiu, X., Catasus, L., Bussaglia, E., Lagarda, H., Garcia, A., Pons, C. et al. (2001) . Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma. *Human Pathology*, 32, 569–77. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.25929>
- [54] Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Sánchez, C., Sarrió, D., Cassia, R., García-Rostán, G. et al. (2002) . Abnormalities of the APC/ β -catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene*, 21, 7981–90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205924>
- [55] Vilar, E. and Gruber, S.B. (2010) . Microsatellite instability in colorectal cancer the stable evidence. *Nature Reviews Clinical Oncology*, Nature Publishing Group. 7, 153–62. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2009.237>
- [56] MacDonald, N.D., Salvesen, H.B., Ryan, A., Iversen, O.E., Akslen, L.A. and Jacobs, I.J. (2000) . Frequency and prognostic impact of microsatellite instability in a large population-based study of endometrial carcinomas. *Cancer Research*, 60, 1750–2.
- [57] Salvesen, H.B., Macdonald, N., Ryan, A., Iversen, O.E., Jacobs, I.J., Akslen, L.A. et al. (2000) . Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 6, 3607–13.
- [58] Doll, A., Abal, M., Rigau, M., Monge, M., Gonzalez, M., Demajo, S. et al. (2008) . Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 108, 221–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.09.020>

- [59] Lax, S.F., Kendall, B., Tashiro, H., Slebos, R.J.C. and Ellenson, L.H. (2000) . The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: Evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer*, 88, 814–24. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000215\)88:4<814::AID-CNCR12>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000215)88:4<814::AID-CNCR12>3.0.CO;2-U)
- [60] Sherman, M.E., Bur, M.E. and Kurman, R.J. (1995) . p53 in endometrial cancer and its putative precursors: Evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Human Pathology*, 26, 1268–74. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90204-X](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90204-X)
- [61] Morrison, C., Zanagnolo, V., Ramirez, N., Cohn, D.E., Kelbick, N., Copeland, L. et al. (2006) . HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: Association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. *Journal of Clinical Oncology*, 24, 2376–85. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.4827>
- [62] Liu, F.S. (2007) . Molecular carcinogenesis of endometrial cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, Taiwan Association of Obstetric & Gynecology. 46, 26–32. [https://doi.org/10.1016/S1028-4559\(08\)60102-3](https://doi.org/10.1016/S1028-4559(08)60102-3)
- [63] Llobet, D., Pallares, J., Yeramian, A., Santacana, M., Eritja, N., Velasco, A. et al. (2009) . Molecular pathology of endometrial carcinoma: Practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *Journal of Clinical Pathology*, 62, 777–85. <https://doi.org/10.1136/jcp.2008.056101>
- [64] Ginath, S., Menczer, J., Fintsi, Y., Ben-Shem, E., Glezerman, M. and Avinoach, I. (2002) . Tissue and serum CA125 expression in endometrial cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 12, 372–5. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1438.2002.01007.x>
- [65] Chao, A., Tang, Y.H., Lai, C.H., Chang, C.J., Chang, S.C., Wu, T.I. et al. (2013) . Potential of an age-stratified CA125 cut-off value to improve the prognostic classification of patients with endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*, 129, 500–4. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.02.032>
- [66] Moore, R.G., Brown, A.K., Miller, M.C., Skates, S., Allard, W.J., Verch, T. et al. (2008) . The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecologic Oncology*, 108, 402–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.10.017>
- [67] Brennan, D.J., Hackethal, A., Metcalf, A.M., Coward, J., Ferguson, K., Oehler, M.K. et al. (2014) . Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer - A population based study. *Gynecologic Oncology*, Elsevier Inc. 132, 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.10.036>
- [68] Scambia, G., Gadducci, A., Panici, P.B., Foti, E., Ferdeghini, M., Ferrandina, G. et al. (1994) . Combined use of CA 125 and CA 15-3 in patients with endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* p. 292–7. <https://doi.org/10.1006/gy.1994.1213>
- [69] Engelman, J.A., Luo, J. and Cantley, L.C. (2006) . The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7, 606–19. <https://doi.org/10.1038/nrg1879>
- [70] Martini, M., De Santis, M.C., Braccini, L., Gulluni, F. and Hirsch, E. (2014) . PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. *Annals of Medicine*, 46, 372–83. <https://doi.org/10.3109/07853890.2014.912836>
- [71] Zhao, L. and Vogt, P.K. (2008) . Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene*, 27, 5486–96. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.244>
- [72] Bader, A.G., Kang, S., Zhao, L. and Vogt, P.K. (2005) . Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nature Reviews Cancer*, 5, 921–9.

- <https://doi.org/10.1038/nrc1753>
- [73] Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., Timms, J. and Waterfield, M.D. (2001) . 3-K INASES : Implications for Development , Class I PI3Ks. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 615–75.
 - [74] Backer, J.M. (2008) . The regulation and function of Class III PI3Ks: Novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, 410, 1–17. <https://doi.org/10.1042/BJ20071427>
 - [75] Scheid, M.P. and Woodgett, J.R. (2001) . PKB/AKT: Functional insights from genetic models. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 760–8. <https://doi.org/10.1038/35096067>
 - [76] Sabatini, D.M. (2006) . mTOR and cancer: Insights into a complex relationship. *Nature Reviews Cancer*, 6, 729–34. <https://doi.org/10.1038/nrc1974>
 - [77] Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005) . Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098–101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
 - [78] Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S. V., Wang, H.G. et al. (2004) . Akt Phosphorylation and Stabilization of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP). *Journal of Biological Chemistry*, 279, 5405–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312044200>
 - [79] Marine, J.C. and Lozano, G. (2010) . Mdm2-mediated ubiquitylation: P53 and beyond. *Cell Death and Differentiation*, Nature Publishing Group. 17, 93–102. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.68>
 - [80] Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J. and Rishi, A.K. (2011) . Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, Elsevier B.V. 1813, 1978–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>
 - [81] Saxton, R.A. and Sabatini, D.M. (2017) . mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, Elsevier Inc. 168, 960–76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
 - [82] Karimi Roshan, M., Soltani, A., Soleimani, A., Rezaie Kahkhaie, K., Afshari, A.R. and Soukhtanloo, M. (2019) . Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. *Biochimie*, Elsevier B.V. 165, 229–34. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.08.003>
 - [83] Ip, C.K.M. and Wong, A.S.T. (2012) . p70 S6 kinase and actin dynamics. *Spermatogenesis*, 2, 44–52. <https://doi.org/10.4161/spmg.19413>
 - [84] Masoud, G.N. and Li, W. (2015) . HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Elsevier. 5, 378–89. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
 - [85] Kunej, T., Godnic, I., Horvat, S., Zorc, M. and Calin, G.A. (2012) . Cross talk between MicroRNA and coding cancer genes. *Cancer Journal (United States)*, 18, 223–31. <https://doi.org/10.1097/PP0.0b013e318258b771>
 - [86] Feinbaum, R., Ambros, V. and Lee, R. (1993) . The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843–54.
 - [87] Stefani, G. and Slack, F.J. (2008) . Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 219–30. <https://doi.org/10.1038/nrm2347>
 - [88] Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-engele, P. and Grimson, A. (2005) . Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433, 769–73.

- [89] Ambros, V. (2004) . The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, 350–5.
- [90] Sack, R., Gatignol, A., Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H. and Filipowicz, W. (2005) . scientific report. *EMBO Rep*, 6, 961–7. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400509>
- [91] Kim, Y., Kim, B. and Kim, V.N. (2016) . Re-evaluation of the roles of DROSHA , Exportin 5 , and DICER in microRNA biogenesis. *PNAS*, 113, 1881–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113>
- [92] Hata, A., Kashima, R., Francisco, S., Cardiovascular, S. and Francisco, S. (2016) . HHS Public Access. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 51, 121–34. <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1117054>.Dysregulation
- [93] Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S. et al. (2004) . Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 2999–3004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307323101>
- [94] Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A. et al. (2006) . microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 9136–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508889103>
- [95] Muralidhar, B., Winder, D., Murray, M., Palmer, R., Barbosa-Morais, N., Saini, H. et al. (2011) . Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *Journal of Pathology*, 224, 496–507. <https://doi.org/10.1002/path.2898>
- [96] Lin, S. and Gregory, R.I. (2015) . MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, Nature Publishing Group. 15, 321–33. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- [97] Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R. and Jacks, T. (2007) . Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics*, 39, 673–7. <https://doi.org/10.1038/ng2003>
- [98] Iwasaki, Y.W., Kiga, K., Kayo, H., Fukuda-Yuzawa, Y., Weise, J., Inada, T. et al. (2013) . Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. *Rna*, 19, 490–7. <https://doi.org/10.1261/rna.036608.112>
- [99] Melo, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R. et al. (2010) . A genetic defect in exportin-5 traps precursor MicroRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*, Elsevier Inc. 18, 303–15. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.007>
- [100] Foulkes, W.D., Priest, J.R. and Duchaine, T.F. (2014) . DICER1: Mutations, microRNAs and mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, Nature Publishing Group. 14, 662–72. <https://doi.org/10.1038/nrc3802>
- [101] Melo, S.A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L.A., Yamamoto, H., Calin, G.A. et al. (2009) . A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nature Genetics*, 41, 365–70. <https://doi.org/10.1038/ng.317>
- [102] Meister, G. (2013) . Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, Nature Publishing Group. 14, 447–59. <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
- [103] Sand, M., Skrygan, M., Georgas, D., Arenz, C., Gambichler, T., Sand, D. et al. (2012) . Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 51, 916–22. <https://doi.org/10.1002/mc.20861>

- [104] Vaksman, O., Hetland, T.E., Trope', C.G., Reich, R. and Davidson, B. (2012) . Argonaute, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression in serous ovarian carcinoma. *Human Pathology*, Elsevier Inc. 43, 2062–9. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.02.016>
- [105] Rupaimoole, R. and Slack, F.J. (2017) . MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, Nature Publishing Group. 16, 203–22. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- [106] Bueno, M.J., de Castro, I.P. and Malumbres, M. (2008) . Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle*, 7, 3143–8. <https://doi.org/10.4161/cc.7.20.6833>
- [107] Meng, F., Henson, R., Ghoshal, K., Jacob, S.T. and Patel, T. (2007) . MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *GASTROENTEROLOGY*, 133, 647–58. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.05.022>
- [108] Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D.P., Patterson, H.C., Zhang, B., Wang, J. et al. (2008) . Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. 9, 405–14. <https://doi.org/10.1038/ni1575>
- [109] Collier, H.A., Forman, J.J. and Legesse-miller, A. (2007) . Transcription of E2F1 while Inhibiting Its Translation via a microRNA Polycistron. *PLoS Genetics*, 3, e46. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030146>
- [110] Sage, C., Nagel, R., David, A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A. et al. (2007) . Regulation of the p27 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *The EMBO Journal*, 26, 3699–708. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601790>
- [111] Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M. V., Ferracin, M., Shimizu, M. et al. (2005) . miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 13944–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506654102>
- [112] Mazzocchi, L., Robaina, M.C., Apa, A.G., Bonamino, M., Pinto, L.W., Queiroga, E. et al. (2018) . MiR-29 silencing modulates the expression of target genes related to proliferation, apoptosis and methylation in Burkitt lymphoma cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, Springer Berlin Heidelberg. 144, 483–97. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2575-3>
- [113] Chang, T., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H. et al. (2007) . Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Molecular Cell*, 26, 745–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.010>
- [114] Gramantieri, L., Fornari, F., Callegari, E., Sabbioni, S., Lanza, G., Croce, C.M. et al. (2008) . MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma: MicroRNA Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12, 2189–204. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00533.x>
- [115] Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Muñoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S. et al. (2008) . A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 268–79. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1399>
- [116] Lal, A., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann, R., Srikantan, S. et al. (2008) . p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. *PloS One*, 3, e1864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001864>
- [117] Lugano, R., Ramachandran, M. and Dimberg, A. (2020) . Tumor angiogenesis: causes,

- p>consequences, challenges and opportunities.
- Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*
- , Springer International Publishing, 77, 1745–70.
- <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7>
- [118] Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G. et al. (2008) . MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 15878–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800731200>
 - [119] Celic, T., Metzinger-Le Meuth, V., Six, I., Massy, Z.A. and Metzinger, L. (2017) . The mir-221/222 Cluster is a Key Player in Vascular Biology via the Fine-Tuning of Endothelial Cell Physiology. *Current Vascular Pharmacology*, 15, 40–6. <https://doi.org/10.2174/1570161114666160914175149>
 - [120] Cao, Y. and Zhang, P.-Y. (2017) . miRNAs in vascular integrity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 473–7. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4515>
 - [121] Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D.R. et al. (2007) . Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science (New York, NY)*, 316, 608–11. <https://doi.org/10.1126/science.1139253>
 - [122] Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N. et al. (2008) . Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nature Immunology*, 9, 1065–73. <https://doi.org/10.1038/ni.1642>
 - [123] Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J., Coppola, D., Dalton, W.S. et al. (2008) . MicroRNA-155 Is Regulated by the Transforming Growth Factor β /Smad Pathway and Contributes to Epithelial Cell Plasticity by Targeting RhoA. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 6773–84. <https://doi.org/10.1128/mcb.00941-08>
 - [124] Gregory, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G. et al. (2008) . The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10, 593–601. <https://doi.org/10.1038/ncb1722>
 - [125] Ma, L., Teruya-Feldstein, J. and Weinberg, R.A. (2007) . Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449, 682–8. <https://doi.org/10.1038/nature06174>
 - [126] Almeida, M.I., Reis, R.M. and Calin, G.A. (2010) . MYC-microRNA-9-metastasis connection in breast cancer. *Cell Research*, Nature Publishing Group, 20, 603–4. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.70>
 - [127] Meng, X., Wu, J., Pan, C., Wang, H., Ying, X., Zhou, Y. et al. (2013) . Genetic and Epigenetic Down-regulation of MicroRNA-212 Promotes Colorectal Tumor Metastasis via Dysregulation of MnSOD. *Gastroenterology*, Elsevier, Inc. 145, 426-436.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.04.004>
 - [128] Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L. et al. (2008) . Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*, 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003694>
 - [129] Fujita, K. and Nonomura, N. (2018) . Urinary biomarkers of prostate cancer. *International Journal of Urology*, 25, 770–9. <https://doi.org/10.1111/iju.13734>
 - [130] Michael, A., Bajracharya, S.D., Yuen, P.S.T., Zhou, H., Star, R.A., Illei, G.G. et al. (2010) . Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*, 16, 34–8. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x>
 - [131] Braicu, O.-L., Budisan, L., Buiga, R., Jurj, A., Achimas-Cadariu, P., Pop, L.A. et al. (2017) . miRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded endometriosis and ovarian cancer samples. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4225–38.

<https://doi.org/10.2147/OTT.S137107>

- [132] Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K. et al. (2008) . Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18, 997–1006. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- [133] Endzeli, E., Melne, V., Kalni, Z., Lietuviētis, V., Rieksti, U., Llorente, A. et al. (2016) . Diagnostic , prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer : a systematic review. *Molecular Cancer*, 15, 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0523-5>
- [134] Nersisyan, S., Shkurnikov, M., Poloznikov, A., Turchinovich, A., Burwinkel, B., Anisimov, N. et al. (2020) . A post-processing algorithm for miRNA microarray data. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–9. <https://doi.org/10.3390/ijms21041228>
- [135] Chen, Y., Gelfond, J.A.L., McManus, L.M. and Shireman, P.K. (2009) . Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, 10, 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-407>
- [136] Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S. and Tewari, M. (2010) . Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50, 298–301. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.032>
- [137] Peltier, H.J. and Latham, G.J. (2008) . Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA (New York, NY)*, 14, 844–52. <https://doi.org/10.1261/rna.939908>
- [138] Hamam, R., Hamam, D., Alsaleh, K.A., Kassem, M., Zaher, W., Alfayez, M. et al. (2017) . Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death & Disease, Nature Publishing Group*, 8, e3045. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.440>
- [139] Ho, S.L., Chan, H.M., Wong, R.N.S. and Li, H.W. (2014) . Self-assembling protein platform for direct quantification of circulating microRNAs in serum with total internal reflection fluorescence microscopy. *Analytica Chimica Acta*, 823, 61–8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.03.020>
- [140] Lusi, E.A., Passamano, M., Guarascio, P., Scarpa, A. and Schiavo, L. (2009) . Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs. *Analytical Chemistry*, 81, 2819–22. <https://doi.org/10.1021/ac8026788>
- [141] Tsang, H.F., Xue, V.W., Koh, S.P., Chiu, Y.M., Ng, L.P.W. and Wong, S.C.C. (2017) . NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, Taylor & Francis. 17, 95–103. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1268533>
- [142] He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S. et al. (2020) . Mirna-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16, 2628–47. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47203>
- [143] Wang, W.T. and Chen, Y.Q. (2014) . Circulating miRNAs in cancer: From detection to therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0086-0>
- [144] Hosseinhali, N., Aghapour, M., Duijf, P.H.G. and Baradaran, B. (2018) . Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 5574–88. <https://doi.org/10.1002/jcp.26514>
- [145] Shah, M.Y., Ferrajoli, A., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G. and Calin, G.A. (2016) . microRNA

- Therapeutics in Cancer — An Emerging Concept. *EBioMedicine*, The Authors. 12, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.017>
- [146] Griveau, A., Bejaud, J., Anthiya, S., Avril, S., Autret, D. and Garcion, E. (2013) . Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *International Journal of Pharmaceutics*, Elsevier B.V. 454, 765–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.049>
- [147] Ebert, M.S., Neilson, J.R. and Sharp, P.A. (2007) . MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature Methods*, 4, 721–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth1079>
- [148] Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D. et al. (2010) . MiR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, 12, 247–56. <https://doi.org/10.1038/ncb2024>
- [149] Mignacca, L., Saint-Germain, E., Benoit, A., Bourdeau, V., Moro, A. and Ferbeyre, G. (2016) . Sponges against miR-19 and miR-155 reactivate the p53-Socs1 axis in hematopoietic cancers. *Cytokine*, Elsevier Ltd. 82, 80–6. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.015>
- [150] Liu, S., Sun, X., Wang, M., Hou, Y., Zhan, Y., Jiang, Y. et al. (2014) . A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NFκB and STAT3 in colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, Elsevier Ltd. 147, 847-859.e11. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.06.006>
- [151] Kim, K., Madak-Erdogan, Z., Ventrella, R. and Katzenellenbogen, B.S. (2013) . A MicroRNA196a2* and TP63 Circuit Regulated by Estrogen Receptor-α and ERK2 that Controls Breast Cancer Proliferation and Invasiveness Properties. *Hormones and Cancer*, 4, 78–91. <https://doi.org/10.1007/s12672-012-0129-3>
- [152] Meng, L., Liu, C., Lü, J., Zhao, Q., Deng, S., Wang, G. et al. (2017) . Small RNA zippers lock miRNA molecules and block miRNA function in mammalian cells. *Nature Communications*, 8, 13964. <https://doi.org/10.1038/ncomms13964>
- [153] Yang, J., Meng, X., Pan, J., Jiang, N., Zhou, C., Wu, Z. et al. (2018) . CRISPR/Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers [Internet]. *RNA Biol.* Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1391443>
- [154] Aquino-Jarquin, G. (2017) . Emerging role of CRISPR/Cas9 technology for MicroRNAs editing in cancer research. *Cancer Research*, 77, 6812–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2142>
- [155] Huo, W., Zhao, Gg., Yin, J., Ouyang, X., Wang, Y., Yang, C. et al. (2017) . Lentiviral CRISPR/Cas9 vector mediated miR-21 gene editing inhibits the epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Journal of Cancer*, 8, 57–64. <https://doi.org/10.7150/jca.16723>
- [156] Bader, A.G., Brown, D. and Winkler, M. (2010) . The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Research*, 70, 7027–30. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2010>
- [157] Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L. et al. (2008) . The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature Medicine*, 14, 1271–7. <https://doi.org/10.1038/nm.1880>
- [158] Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M. et al. (2010) . Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*, Nature Publishing Group. 29, 1580–7. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.445>
- [159] Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W. et

- al. (2009) . Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model. *Cell, Elsevier Inc.* 137, 1005–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.021>
- [160] Chen, Y., Gao, D.Y. and Huang, L. (2015) . In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier B.V.* 81, 128–41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.009>
- [161] Labatut, A.E. and Mattheolabakis, G. (2018) . Non-viral based miR delivery and recent developments. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Elsevier.* 128, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.04.018>
- [162] Chen, Y., Chen, H. and Shi, J. (2014) . Inorganic nanoparticle-based drug codelivery nanosystems to overcome the multidrug resistance of cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*, 11, 2495–510. <https://doi.org/10.1021/mp400596v>
- [163] Campani, V., Salzano, G., Lusa, S. and de Rosa, G. (2016) . Lipid nanovectors to deliver RNA oligonucleotides in cancer. *Nanomaterials*, 6, 1–22. <https://doi.org/10.3390/nano6070131>
- [164] HE, T., LF, L., GJ, D., WT, W., SC, C., ML, K. et al. (2012) . Pro-opiomelanocortin gene delivery suppresses the growth of established Lewis lung carcinoma through a melanocortin-1 receptor-independent pathway. *Journal of Gene Medicine*, 14, 44–53. <https://doi.org/10.1002/jgm>
- [165] Qian, X., Long, L., Shi, Z., Liu, C., Qiu, M., Sheng, J. et al. (2014) . Star-branched amphiphilic PLA-b-PDMAEMA copolymers for co-delivery of miR-21 inhibitor and doxorubicin to treat glioma. *Biomaterials, Elsevier Ltd.* 35, 2322–35. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.039>
- [166] Li, Y., Dai, Y., Zhang, X. and Chen, J. (2017) . Three-layered polyplex as a microRNA targeted delivery system for breast cancer gene therapy. *Nanotechnology, IOP Publishing.* 28. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa757f>
- [167] Beg, M.S., Brenner, A.J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y.K., Stoudemire, J. et al. (2017) . Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs, Investigational New Drugs.* 35, 180–8. <https://doi.org/10.1007/s10637-016-0407-y>
- [168] van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S.C., Linton, A., Boyer, M.J., Clarke, S. et al. (2017) . Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet Oncology, Elsevier Ltd.* 18, 1386–96. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30621-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30621-6)
- [169] Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D. et al. (2016) . Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38, 42–9. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- [170] Shao, R., Li, X., Feng, Y., Lin, J.F. and Billig, H. (2014) . Direct effects of metformin in the endometrium: A hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 33, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-41>
- [171] Xie, Y., Wang, Y.L., Yu, L., Hu, Q., Ji, L., Zhang, Y. et al. (2011) . Metformin promotes progesterone receptor expression via inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in endometrial cancer cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*

- Biology, 126, 113–20. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.006>
- [172] Wang, C.F., Zhang, G., Zhao, L.J., Qi, W.J., Li, X.P., Wang, J.L. et al. (2013) . Overexpression of the Insulin Receptor Isoform A Promotes Endometrial Carcinoma Cell Growth. PLoS ONE, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069001>
- [173] Dong, P., Konno, Y., Watari, H., Hosaka, M., Noguchi, M. and Sakuragi, N. (2014) . The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. Journal of Translational Medicine, 12, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0231-0>
- [174] Wang, H., Zhang, G., Zhang, H., Zhang, F., Zhou, B., Ning, F. et al. (2014) . Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/ β -catenin/Snail signaling pathway. European Journal of Pharmacology, Elsevier. 723, 156–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.004>
- [175] Gao, Y., Luo, L.H., Li, S. and Yang, C. (2014) . MiR-17 inhibitor suppressed osteosarcoma tumor growth and metastasis via increasing PTEN expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, Elsevier Inc. 444, 230–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.061>
- [176] Garofalo, M., Di Leva, G., Romano, G., Nuovo, G., Suh, S.S., Ngankee, A. et al. (2009) . miR-221&222 Regulate TRAIL Resistance and Enhance Tumorigenicity through PTEN and TIMP3 Downregulation. Cancer Cell, Elsevier Ltd. 16, 498–509. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.10.014>
- [177] Zhao, Y.S., Yang, W.C., Xin, H.W., Han, J.X. and Ma, S.G. (2019) . MiR-182-5p knockdown targeting PTEN inhibits cell proliferation and invasion of breast cancer cells. Yonsei Medical Journal, 60, 148–57. <https://doi.org/10.3349/ymj.2019.60.2.148>
- [178] Yuan, J., Su, Z., Gu, W., Shen, X., Zhao, Q., Shi, L. et al. (2019) . MiR-19b and miR-20a suppress apoptosis, promote proliferation and induce tumorigenicity of multiple myeloma cells by targeting PTEN. Cancer Biomarkers, 24, 279–89. <https://doi.org/10.3233/CBM-182182>
- [179] Zhang, B., Liu, Y. and Zhang, J. (2019) . Silencing of miR-19a-3p enhances osteosarcoma cells chemosensitivity by elevating the expression of tumor suppressor PTEN. Oncology Letters, 17, 414–21. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9592>
- [180] Wang, Y., Tang, Q., Li, M., Jiang, S. and Wang, X. (2014) . MicroRNA-375 inhibits colorectal cancer growth by targeting PIK3CA. Biochemical and Biophysical Research Communications, Elsevier Inc. 444, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.028>
- [181] Yu, Q.Q., Wu, H., Huang, X., Shen, H., Shu, Y.Q., Zhang, B. et al. (2014) . MiR-1 targets PIK3CA and inhibits tumorigenic properties of A549 cells. Biomedicine and Pharmacotherapy, Elsevier Masson SAS. 68, 155–61. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.01.005>
- [182] Wu, D., Ding, J., Wang, L., Pan, H., Zhou, Z., Zhou, J. et al. (2013) . MicroRNA-125b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer. Oncology Letters, 5, 829–34. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1123>
- [183] Rahman, M.A., Salajegheh, A., Smith, R.A. and Lam, A.K. yin. (2015) . MicroRNA-126 suppresses proliferation of undifferentiated (BRAFFV600E and BRAFWT) thyroid carcinoma through targeting PIK3R2 gene and repressing PI3K-AKT proliferation-survival signalling pathway. Experimental Cell Research, Elsevier. 339, 342–50. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.09.010>

- [184] Arcaroli, J.J., Quackenbush, K.S., Powell, R.W., Pitts, T.M., Spreafico, A., Varella-Garcia, M. et al. (2012) . Common PIK3CA mutants and a novel 3' UTR mutation are associated with increased sensitivity to saracatinib. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18, 2704–14. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3167>
- [185] Zhu, J., Zhou, L., Wei, B., Qian, Z., Wang, J., Hui, H. et al. (2020) . MiR-142-5p inhibits pancreatic cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CA. *Molecular Medicine Reports*, 22, 2085–92. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11251>
- [186] Ma, X., Jin, L., Lei, X., Tong, J. and Wang, R. (2020) . MicroRNA-363-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cells via the Akt/mTOR signaling pathway by targeting PIK3CA. *Oncology Reports*, 43, 1365–74. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7544>
- [187] Zhang, Z., Zhang, L., Wang, B., Wei, R., Wang, Y., Wan, J. et al. (2020) . MiR-337-3p suppresses proliferation of epithelial ovarian cancer by targeting PIK3CA and PIK3CB. *Cancer Letters*, Elsevier B.V. 469, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.10.021>
- [188] Zhang, J., Ren, L., Yu, M., Liu, X., Ma, W., Huang, L. et al. (2019) . S-equal inhibits proliferation and promotes apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via regulating miR-10a-5p and PI3K/AKT pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Elsevier. 672, 108064. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108064>
- [189] Hsu, C.Y., Hsieh, T.H., Er, T.K., Chen, H.S., Tsai, C.C. and Tsai, E.M. (2018) . MiR-381 regulates cell motility, growth and colony formation through PIK3CA in endometriosis-associated clear cell and endometrioid ovarian cancer. *Oncology Reports*, 40, 3734–42. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6779>
- [190] You, W., Zhang, X., Ji, M., Yu, Y., Chen, C., Xiong, Y. et al. (2018) . miR-152-5p as a microRNA passenger strand special functions in human gastric cancer cells. *International Journal of Biological Sciences*, 14, 644–53. <https://doi.org/10.7150/ijbs.25272>
- [191] Ge, S., Wang, D., Kong, Q., Gao, W. and Sun, J. (2017) . Function of miR-152 as a Tumor Suppressor in Human Breast Cancer by Targeting PIK3CA. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 25, 1363–71. <https://doi.org/10.3727/096504017X14878536973557>
- [192] Wang, J.X., Jia, X.J., Liu, Y., Dong, J.H., Ren, X.M., Xu, O. et al. (2020) . Silencing of miR-17-5p suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis by directly targeting PIK3R1 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell International*, 20, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1096-3>
- [193] He, S., Zhang, W., Li, X., Wang, J., Chen, X., Chen, Y. et al. (2021) . Oral squamous cell carcinoma (OSCC)-derived exosomal MiR-221 targets and regulates phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1) to promote human umbilical vein endothelial cells migration and tube formation. *Bioengineered*, Taylor & Francis. 12, 2164–74. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1932222>
- [194] Tian, F., Wang, J., Ouyang, T., Lu, N., Lu, J., Shen, Y. et al. (2019) . MiR-486-5p serves as a good biomarker in nonsmall cell lung cancer and suppresses cell growth with the involvement of a target PIK3R1. *Frontiers in Genetics*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00688>
- [195] Tan, A., Luo, R. and Ruan, P. (2019) . miR-495 promotes apoptosis and inhibits proliferation in endometrial cells via targeting PIK3R1. *Pathology Research and Practice*, Elsevier. 215, 594–9. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.01.020>
- [196] Hong, B.S., Ryu, H.S., Kim, N., Kim, J., Lee, E., Moon, H. et al. (2019) . Tumor suppressor

- miRNA-204-5p regulates growth, metastasis, and immune microenvironment remodeling in breast cancer. *Cancer Research*, 79, 1520–34. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0891>
- [197] Riquelme, I., Tapia, O., Leal, P., Sandoval, A., Varga, M.G., Letelier, P. et al. (2016) . miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cellular Oncology*, 39, 23–33. <https://doi.org/10.1007/s13402-015-0247-3>
- [198] Bu, Q., You, F., Pan, G., Yuan, Q., Cui, T., Hao, L. et al. (2017) . MiR-125b inhibits anaplastic thyroid cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CD. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier Masson SAS. 88, 443–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.090>
- [199] Yuan, T., Yang, Y., Chen, J., Li, W., Li, W., Zhang, Q. et al. (2017) . Regulation of PI3K signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: A novel PTEN/Ikaros/miR-26b mechanism reveals a critical targetable role for PIK3CD. *Leukemia*, 31, 2355–64. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.80>
- [200] Jin, W., Liang, Y., Li, S., Lin, G., Liang, H., Zhang, Z. et al. (2021) . MiR-513b-5p Represses Autophagy During the Malignant Progression of Hepatocellular Carcinoma by Targeting PIK3R3. *Aging*, 13, 16072–87. <https://doi.org/10.18632/aging.203135>
- [201] Song, Y., He, S., Zhuang, J., Wang, G., Ni, J., Zhang, S. et al. (2019) . MicroRNA-601 serves as a potential tumor suppressor in hepatocellular carcinoma by directly targeting PIK3R3. *Molecular Medicine Reports*, 19, 2431–9. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9857>
- [202] Lu, J., Tang, L., Xu, Y., Ge, K., Huang, J., Gu, M. et al. (2018) . Mir-1287 suppresses the proliferation, invasion, and migration in hepatocellular carcinoma by targeting PIK3R3. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 9229–38. <https://doi.org/10.1002/jcb.27190>
- [203] Ma, H.Z., Wang, J., Shi, J., Zhang, W. and Zhou, D.S. (2020) . MicroRNA-29c-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation through targeting PIK3R3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24, 2239–47. https://doi.org/10.26355/eurev_202003_20489
- [204] Noguchi, S., Yasui, Y., Iwasaki, J., Kumazaki, M., Yamada, N., Naito, S. et al. (2013) . Replacement treatment with microRNA-143 and -145 induces synergistic inhibition of the growth of human bladder cancer cells by regulating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Cancer Letters*, Elsevier Ireland Ltd. 328, 353–61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.017>
- [205] Cui, W., Zhang, S., Shan, C., Zhou, L. and Zhou, Z. (2013) . MicroRNA-133a regulates the cell cycle and proliferation of breast cancer cells by targeting epidermal growth factor receptor through the EGFR/Akt signaling pathway. *FEBS Journal*, 280, 3962–74. <https://doi.org/10.1111/febs.12398>
- [206] Khandelwal, A., Sharma, U., Barwal, T.S., Seam, R.K., Gupta, M., Rana, M.K. et al. (2021) . Circulating miR-320a Acts as a Tumor Suppressor and Prognostic Factor in Non-small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.645475>
- [207] Zheng, T.-L., Li, D.-P., He, Z.-F. and Zhao, S. (2019) . miR-145 sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to cisplatin through directly inhibiting PI3K/AKT signaling pathway. *Cancer Cell International*, BioMed Central. 19, 250. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0943-6>
- [208] Boufraquech, M., Zhang, L., Jain, M., Patel, D., Ellis, R., Xiong, Y. et al. (2014) . miR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3. *Endocrine-Related Cancer*, 21, 517–31. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0077>

- [209] Wang, F., Wang, W., Lu, L., Xie, Y., Yan, J., Chen, Y. et al. (2020) . MicroRNA-16-5p regulates cell survival, cell cycle and apoptosis by targeting AKT3 in prostate cancer cells. *Oncology Reports*, 44, 1282–92. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7682>
- [210] Luo, B., Ma, L., Xing, X., Wang, Z.R., Teng, Q. and Li, S.G. (2020) . MiR-22-3p regulates the proliferation and invasion of Wilms' tumor cells by targeting AKT3. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24, 5996–6004. https://doi.org/10.26355/eurev_202006_21493
- [211] You, A., Fu, L., Li, Y., Li, X. and You, B. (2020) . MicroRNA-203 restrains epithelial-mesenchymal transition, invasion and migration of papillary thyroid cancer by downregulating AKT3. *Cell Cycle, Taylor & Francis*. 19, 1105–21. <https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1746490>
- [212] Zeng, M., Zhou, Y., Zhang, Y., Wang, T. and Wang, J. (2019) . Role of MIR-489 in the proliferation and apoptosis of pancreatic carcinoma. *Journal of BUON*, 24, 1574–80.
- [213] Zhu, B., Mitheera, V., Finch-edmondson, M., Lee, Y., Wan, Y., Sudol, M. et al. (2021) . MiR-582-5p is a tumor suppressor microRNA targeting the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Cancers*, 13, 1–21. <https://doi.org/10.3390/cancers13040756>
- [214] Fang, Y., Xue, J.L., Shen, Q., Chen, J. and Tian, L. (2012) . MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 55, 1852–62. <https://doi.org/10.1002/hep.25576>
- [215] Doghman, M., El Wakil, A., Cardinaud, B., Thomas, E., Wang, J., Zhao, W. et al. (2010) . Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by MicroRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Research*, 70, 4666–75. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3970>
- [216] Merkel, O., Hamacher, F., Laimer, D., Sifft, E., Trajanoski, Z., Scheideler, M. et al. (2010) . Identification of differential and functionally active miRNAs in both anaplastic lymphoma kinase (ALK)+ and ALK- anaplastic large-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 16228–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009719107>
- [217] Dong, Z., Qi, R., Guo, X., Zhao, X., Li, Y., Zeng, Z. et al. (2017) . MiR-223 modulates hepatocellular carcinoma cell proliferation through promoting apoptosis via the Rab1-mediated mTOR activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier Ltd. 483, 630–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.091>
- [218] Cui, Y., Zhao, J., Yi, L. and Jiang, Y. (2016) . microRNA-153 targets mTORC2 component rictor to inhibit glioma cells. *PLoS ONE*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156915>
- [219] Lv, T., Liu, Y., Li, Z., Huang, R., Zhang, Z. and Li, J. (2018) . MiR-503 is down-regulated in osteosarcoma and suppressed MG63 proliferation and invasion by targeting VEGFA/Rictor. *Cancer Biomarkers*, 23, 315–22. <https://doi.org/10.3233/CBM-170906>
- [220] Li, J., Li, X., Wang, J., Wang, Y. and Qiu, H. (2015) . MicroRNA-218 increases cellular sensitivity to Rapamycin via targeting Rictor in cervical cancer. *Apmis*, 123, 562–70. <https://doi.org/10.1111/apm.12387>
- [221] Wan, G., Xie, W., Liu, Z., Xu, W., Lao, Y., Huang, N. et al. (2014) . Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway. *Autophagy*, 10, 70–9. <https://doi.org/10.4161/auto.26534>
- [222] Chen, M. Bin, Wei, M.X., Han, J.Y., Wu, X.Y., Li, C., Wang, J. et al. (2014) . MicroRNA-451 regulates AMPK/mTORC1 signaling and fascin1 expression in HT-29 colorectal cancer.

- Cellular Signalling, Elsevier B.V. 26, 102–9. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.07.017>
- [223] Fan, H., Jiang, M., Li, B., He, Y., Huang, C., Luo, D. et al. (2018) . MicroRNA-let-7a regulates cell autophagy by targeting Rictor in gastric cancer cell lines MGC-803 and SGC-7901. *Oncology Reports*, 39, 1207–14. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6194>
- [224] Xu, L., Wen, Z., Zhou, Y., Liu, Z., Li, Q., Fei, G. et al. (2013) . MicroRNA-7-regulated TLR9 signaling-enhanced growth and metastatic potential of human lung cancer cells by altering the phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3/Akt pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 24, 42–55. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-07-0519>
- [225] Sun, X., Li, J., Sun, Y., Zhang, Y., Dong, L., Shen, C. et al. (2016) . miR-7 reverses the resistance to BRAFi in melanoma by targeting EGFR/IGF-1R/CRAF and inhibiting the MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. *Oncotarget*, 7, 53558–70. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10669>
- [226] Xie, J., Chen, M., Zhou, J., Mo, M.S., Zhu, L.H., Liu, Y.P. et al. (2014) . MiR-7 inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer cells by suppressing epidermal growth factor receptor expression. *Oncology Reports*, 31, 1715–22. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3052>
- [227] Xu, N., Lian, Y.J., Dai, X. and Wang, Y.J. (2017) . miR-7 Increases Cisplatin Sensitivity of Gastric Cancer Cells Through Suppressing mTOR. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 16, 1022–30. <https://doi.org/10.1177/1533034617717863>
- [228] Dhar, S., Kumar, A., Rimando, A.M., Zhang, X. and Levenson, A.S. (2015) . Resveratrol and pterostilbene epigenetically restore PTEN expression by targeting oncomiRs of the miR-17 family in prostate cancer. *Oncotarget*, 6, 27214–26. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4877>
- [229] Lin, Y.H., Liao, C.J., Huang, Y.H., Wu, M.H., Chi, H.C., Wu, S.M. et al. (2013) . Thyroid hormone receptor represses miR-17 expression to enhance tumor metastasis in human hepatoma cells. *Oncogene*, 32, 4509–18. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.309>
- [230] Rao, E., Jiang, C., Ji, M., Huang, X., Iqbal, J., Lenz, G. et al. (2012) . The miRNA-17 ~ 92 cluster mediates chemoresistance and enhances tumor growth in mantle cell lymphoma via PI3K/AKT pathway activation. *Leukemia*, 26, 1064–72. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.305>
- [231] Calderaro, J., Rebouissou, S., De Koning, L., Masmoudi, A., Hérault, A., Dubois, T. et al. (2014) . PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 134, 1776–84. <https://doi.org/10.1002/ijc.28518>
- [232] He, C., Dong, X., Zhai, B., Jiang, X., Dong, D., Li, B. et al. (2015) . MiR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/Akt pathway. *Oncotarget*, 6, 28867–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4814>
- [233] Dey, N., Ghosh-Choudhury, N., Kasinath, B.S. and Choudhury, G.G. (2012) . TGFβ-Stimulated MicroRNA-21 Utilizes PTEN to Orchestrate AKT/mTORC1 Signaling for Mesangial Cell Hypertrophy and Matrix Expansion. *Tsilibary EC*, editor. *PLoS ONE*, 7, e42316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042316>
- [234] Gao, C., Zhou, C., Zhuang, J., Liu, L., Liu, C., Li, H. et al. (2018) . MicroRNA expression in cervical cancer: Novel diagnostic and prognostic biomarkers. *J. Cell. Biochem.* p. 7080–90. <https://doi.org/10.1002/jcb.27029>
- [235] Du, J., Qian, J., Zheng, B., Xu, G., Chen, H. and Chen, C. (2021) . MiR-21-5p is a biomarker for predicting prognosis of lung adenocarcinoma by regulating PIK3R1 expression. *International Journal of General Medicine*, 14, 8873–80. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S337149>

- [236] Cui, F., Li, X., Zhu, X., Huang, L., Huang, Y., Mao, C. et al. (2012) . MiR-125b inhibits tumor growth and promotes apoptosis of cervical cancer cells by targeting phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit delta. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30, 1310–8. <https://doi.org/10.1159/000343320>
- [237] Li, J., You, T. and Jing, J. (2014) . MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Proliferation*, 47, 152–60. <https://doi.org/10.1111/cpr.12093>
- [238] Li, J.-C. and Zheng, J.-Q. (2017) . Effect of microRNA-145 on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells by regulating mTOR signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1–30. <https://doi.org/10.1002/jcb.26629>
- [239] Li, B., Ding, C.M., Li, Y.X., Peng, J.C., Geng, N. and Qin, W.W. (2018) . MicroRNA-145 inhibits migration and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through regulation of the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway. *Oncology Reports*, 40, 2944–54. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6666>
- [240] Ye, D., Zhou, C., Deng, H., Lin, L. and Zhou, S. (2019) . MicroRNA-145 inhibits growth of laryngeal squamous cell carcinoma by targeting the PI3K/ Akt signaling pathway. *Cancer Management and Research*, 11, 3801–12. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S199291>
- [241] Boufraquech, M., Zhang, L., Jain, M., Patel, D., Ellis, R., Xiong, Y. et al. (2014) . MiR-145 suppresses thyroid cancer growth and metastasis and targets AKT3. *Endocrine-Related Cancer*, 21, 517–31. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0077>
- [242] Rokah, O.H., Granot, G., Ovcharenko, A., Modai, S., Pasmanik-Chor, M., Toren, A. et al. (2012) . Downregulation of miR-31, miR-155, and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. *PloS One*, 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035501>
- [243] Tiago, D.M., Conceição, N., Caiado, H., Laizé, V. and Cancela, M.L. (2016) . Matrix Gla protein repression by MIR-155 promotes oncogenic signals in breast cancer MCF-7 cells. *FEBS Letters*, 590, 1234–41. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12155>
- [244] Wang, L., Tang, B., Han, H., Mao, D., Chen, J., Zeng, Y. et al. (2018) . MiR-155 Affects Osteosarcoma MG-63 Cell Autophagy Induced by Adriamycin Through Regulating PTEN-PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 33, 32–8. <https://doi.org/10.1089/cbr.2017.2306>
- [245] Kong, X., Liu, F. and Gao, J. (2016) . MiR-155 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells through the activation of PI3K/SGK3/ β -catenin signaling pathways. *Oncotarget*, 7, 66051–60. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11800>
- [246] Huang, X., Shen, Y., Liu, M., Bi, C., Jiang, C., Iqbal, J. et al. (2012) . Quantitative proteomics reveals that miR-155 regulates the PI3K-AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Pathology*, 181, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.03.013>
- [247] Dai, C., Xie, Y., Zhuang, X. and Yuan, Z. (2018) . MiR-206 inhibits epithelial ovarian cancer cells growth and invasion via blocking c-Met/AKT/mTOR signaling pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier. 104, 763–70. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.077>
- [248] Liu, F., Zhao, X., Qian, Y., Zhang, J., Zhang, Y. and Yin, R. (2017) . MiR-206 inhibits Head and neck squamous cell carcinoma cell progression by targeting HDAC6 via PTEN/AKT/mTOR pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier. 96, 229–37. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.145>
- [249] Wang, N., Feng, T., Liu, X. and Liu, Q. (2020) . Curcumin inhibits migration and invasion of

- non-small cell lung cancer cells through up-regulation of miR-206 and suppression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Acta Pharmaceutica*, 70, 399–409. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0029>
- [250] Chen, Q., Jiao, D., Wu, Y., Chen, J., Wang, J., Tang, X. et al. (2016) . MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway. *Oncotarget*, 7, 18247–61. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7570>
- [251] Zhang, J., Fa, X. and Zhang, Q. (2019) . MicroRNA-206 exerts anti-oncogenic functions in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing the c-Met/AKT/mTOR pathway. *Molecular Medicine Reports*, 19, 1491–500. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9775>
- [252] Du, J., Wang, L.N., Li, C.X., Yang, H.L., Li, Y.B., Hu, H. et al. (2016) . MicroRNA-221 targets PTEN to reduce the sensitivity of cervical cancer cells to gefitinib through the PI3K/Akt signaling pathway. *Tumor Biology*, 37, 3939–47. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4247-8>
- [253] Kim, J., Jiang, J., Badawi, M. and Schmittgen, T.D. (2017) . miR-221 regulates CD44 in hepatocellular carcinoma through the PI3K-AKT-mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier Ltd. 487, 709–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.121>
- [254] Zhao, G., Cai, C., Yang, T., Qiu, X., Liao, B., Li, W. et al. (2013) . MicroRNA-221 Induces Cell Survival and Cisplatin Resistance through PI3K/Akt Pathway in Human Osteosarcoma. Cheng JQ, editor. *PLoS ONE*, 8, e53906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053906>
- [255] Pan, X., Hong, X., Lai, J., Cheng, L., Cheng, Y., Yao, M. et al. (2020) . Exosomal MicroRNA-221-3p Confers Adriamycin Resistance in Breast Cancer Cells by Targeting PIK3R1. *Frontiers in Oncology*, 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00441>
- [256] Wong, Q.W.L., Ching, A.K.K., Chan, A.W.H., Choy, K.W., To, K.F., Lai, P.B.S. et al. (2010) . MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clinical Cancer Research*, 16, 867–75. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1840>
- [257] Wu, W., Chen, X., Yu, S., Wang, R., Zhao, R. and Du, C. (2018) . microRNA-222 promotes tumor growth and confers radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by targeting PTEN. *Molecular Medicine Reports*, 17, 1305–10. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7931>
- [258] Zhu, X., Shen, H., Yin, X., Yang, M., Wei, H., Chen, Q. et al. (2019) . Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 38, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1095-1>
- [259] Fang, Y., Xu, C. and Fu, Y. (2015) . MicroRNA-17-5p induces drug resistance and invasion of ovarian carcinoma cells by targeting PTEN signaling. *Journal of Biological Research-Thessaloniki, BioMed Central*. 22, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40709-015-0035-2>
- [260] Zhou, K., Fan, Y. and Wu, P. (2020) . Retraction to: MicroRNA-145 inhibits the activation of the mtor signaling pathway to suppress the proliferation and invasion of invasive pituitary adenoma cells by targeting akt3 in vivo and in vitro (*Onco Targets Ther.*, (2017), 10, (1625-1635)). *OncoTargets and Therapy*, 13, 6851. <https://doi.org/10.2147/OTT.S270076>
- [261] Srivastava, S.K., Ahmad, A., Zubair, H., Miree, O., Singh, S., Rocconi, R.P. et al. (2017) . MicroRNAs in gynecological cancers: Small molecules with big implications. *Cancer*

- Letters, Elsevier Ireland Ltd. 407, 123–38. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.011>
- [262] Kong, J., He, X., Wang, Y. and Li, J. (2019) . Effect of microRNA-29b on proliferation, migration, and invasion of endometrial cancer cells. *Journal of International Medical Research*, 47, 3803–17. <https://doi.org/10.1177/0300060519844403>
- [263] Li, Y., Zhang, Z., Zhang, X., Lin, Y., Luo, T., Xiao, Z. et al. (2016) . A dual PI3K/AKT/mTOR signaling inhibitor miR-99a suppresses endometrial carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 8, 719–31.
- [264] Zhang, S., Wang, M., Li, Q. and Zhu, P. (2017) . MiR-101 reduces cell proliferation and invasion and enhances apoptosis in endometrial cancer via regulating PI3K/Akt/mTOR. *Cancer Biomarkers*, 21, 189–96. <https://doi.org/10.3233/CBM-170620>
- [265] Huang, C. and Hu, G. (2018) . Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Bioscience Reports*, 38. <https://doi.org/10.1042/BSR20171546>
- [266] Tsuruta, T., Kozaki, K.I., Uesugi, A., Furuta, M., Hirasawa, A., Imoto, I. et al. (2011) . miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Research*, 71, 6450–62. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0364>
- [267] Zhuang, L., Qu, H., Cong, J., Dai, H. and Liu, X. (2019) . MiR-181c affects estrogen-dependent endometrial carcinoma cell growth by targeting PTEN. *Endocrine Journal*, 66, 523–33. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0538>
- [268] Wu, D., Huang, H.J., He, C.N. and Wang, K.Y. (2013) . MicroRNA-199a-3p regulates endometrial cancer cell proliferation by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR). *International Journal of Gynecological Cancer*, 23, 1191–7. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31829ea779>
- [269] Chen, R., Zhang, M., Liu, W., Chen, H., Cai, T., Xiong, H. et al. (2019) . Estrogen affects the negative feedback loop of PTENP1-miR200c to inhibit PTEN expression in the development of endometrioid endometrial carcinoma. *Cell Death and Disease*, Springer US. 10. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1207-4>
- [270] Zhang, G., Hou, X., Li, Y. and Zhao, M. (2014) . MiR-205 inhibits cell apoptosis by targeting phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten in endometrial cancer ishikawa cells. *BMC Cancer*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-440>
- [271] Zhu, L., Wang, X., Wang, T., Zhu, W. and Zhou, X. (2019) . MiR-494-3p promotes the progression of endometrial cancer by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway. *Molecular Medicine Reports*, 19, 581–8. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9649>
- [272] Torres, A., Torres, K., Pesci, A., Ceccaroni, M., Paszkowski, T., Cassandrini, P. et al. (2012) . Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-369>
- [273] Lee, J.-W., Park, Y.-A., Choi, J.-J., Lee, Y.Y., Kim, C.-J., Choi, C. et al. (2011) . The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma. *Gynecologic Oncology*, Elsevier Inc. 120, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.09.022>
- [274] Snowdon, J., Zhang, X., Childs, T., Tron, V.A. and Feilottter, H. (2011) . The microRNA-200 family is upregulated in endometrial carcinoma. *PLoS ONE*, 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022828>
- [275] Chung, T.K.H., Cheung, T.H., Huen, N.Y., Wong, K.W.Y., Lo, K.W.K., Yim, S.F. et al. (2009) . Dysregulated microRNAs and their predicted targets associated with endometrioid endometrial adenocarcinoma in Hong Kong women. *International Journal of Cancer*, 124,

- 1358–65. <https://doi.org/10.1002/ijc.24071>
- [276] Torres, A., Torres, K., Pesci, A., Ceccaroni, M., Paszkowski, T., Cassandrini, P. et al. (2013) . Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *International Journal of Cancer*, 132, 1633–45. <https://doi.org/10.1002/ijc.27840>
- [277] Fujino, T., Risinger, J.I., Collins, N.K., Liu, F.S., Nishii, H., Takahashi, H. et al. (1994) . Allelotype of Endometrial Carcinoma. *Cancer Research*, 54, 4294–8.
- [278] Zhang, H.H., Li, R., Li, Y.J., Yu, X.X., Sun, Q.N., Li, A.Y. et al. (2020) . EIF4E-related miR-320a and miR-340-5p inhibit endometrial carcinoma cell metastatic capability by preventing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Reports*, 43, 447–60. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7437>
- [279] Li, H.L., Sun, J.J., Ma, H., Liu, S.J., Li, N., Guo, S.J. et al. (2019) . MicroRNA-23a inhibits endometrial cancer cell development by targeting SIX1. *Oncology Letters*, 18, 3792–802. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10694>
- [280] van Sinderen, M., Griffiths, M., Menkhorst, E., Niven, K. and Dimitriadis, E. (2019) . Restoration of microRNA-29c in type I endometrioid cancer reduced endometrial cancer cell growth. *Oncology Letters*, 18, 2684–93. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10588>
- [281] Hu, Y., Wu, A.Y., Xu, C., Song, K.Q., Wang, W.J., Yin, X. et al. (2019) . MicroRNA-449a inhibits tumor metastasis through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting steroid receptor coactivator (SRC) in endometrial cancer. *Journal of Cancer*, 10, 547–55. <https://doi.org/10.7150/jca.27748>
- [282] Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) . Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25, 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- [283] Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W. and Bartel, D.P. (2015) . Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, 4, 1–38. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- [284] Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R. and Hofacker, I.L. (2008) . The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36, 70–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- [285] Popena, M., Szachniuk, M., Antczak, M., Purzycka, K.J., Lukasiak, P., Bartol, N. et al. (2012) . Automated 3D structure composition for large RNAs. *Nucleic Acids Research*, 40, 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks339>
- [286] Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R. and Wolfson, H.J. (2005) . PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research*, 33, 363–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>
- [287] Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E. and Jemal, A. (2021) . Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- [288] Matias-Guiu, X. and Prat, J. (2013) . Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology*, 62, 111–23. <https://doi.org/10.1111/his.12053>
- [289] Cheung, L.W.T., Hennessy, B.T., Li, J., Yu, S., Myers, A.P., Djordjevic, B. et al. (2011) . High Frequency of PIK3R1 and PIK3R2 Mutations in Endometrial Cancer Elucidates a Novel Mechanism for Regulation of PTEN Protein Stability. *Cancer Discovery*, 1, 170–85. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0039>
- [290] Li, L. and Ma, L. (2018) . Upregulation of miR-582-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting AKT3 in human endometrial carcinoma. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 965–70. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.03.007>

- [291] Banno, K., Yanokura, M., Kisu, I., Yamagami, W., Susumu, N. and Aoki, D. (2013) . MicroRNAs in endometrial cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, 18, 186–92. <https://doi.org/10.1007/s10147-013-0526-9>
- [292] Boren, T., Xiong, Y., Hakam, A., Wenham, R., Apte, S., Wei, Z.Z. et al. (2008) . MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecologic Oncology*, 110, 206–15. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.03.023>
- [293] Wu, W., Lin, Z., Zhuang, Z. and Liang, X. (2009) . Expression profile of mammalian MicroRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *European Journal of Cancer Prevention*, 18, 50–5. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328305a07a>
- [294] Zhang, Y. (2013) . RNA-induced Silencing Complex (RISC). *Encyclopedia of Systems Biology*, Springer New York, New York, NY. p. 1876–1876. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9863-7_329
- [295] Höck, J. and Meister, G. (2008) . The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-210>
- [296] Elkayam, E., Kuhn, C., Tocilj, A., Haase, A.D., Greene, E.M., Hannon, G.J. et al. (2012) . The Structure of Human Argonaute-2 in Complex with miR-20a. *Cell*, Elsevier Inc. 150, 100–10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.017>
- [297] Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R. (2011) . A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science*, 331, 550–3. <https://doi.org/10.1126/science.1191138>
- [298] Li, J., Kim, T.H., Nutiu, R., Ray, D., Hughes, T.R. and Zhang, Z. (2014) . Identifying mRNA sequence elements for target recognition by human Argonaute proteins. *Genome Research*, 24, 775–85. <https://doi.org/10.1101/gr.162230.113>
- [299] Jafarnejad, S.M., Ardekani, G.S., Ghaffari, M., Martinka, M. and Li, G. (2013) . Sox4-mediated Dicer expression is critical for suppression of melanoma cell invasion. *Oncogene*, 32, 2131–9. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.239>
- [300] Völler, D., Reinders, J., Meister, G. and Bosserhoff, A.K. (2013) . Strong reduction of AGO2 expression in melanoma and cellular consequences. *British Journal of Cancer*, 109, 3116–24. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.646>
- [301] Sun, R., Gao, C.L., Li, D.H., Li, B.J. and Ding, Y.H. (2017) . Expression Status of PIWIL1 as a Prognostic Marker of Colorectal Cancer. *Disease Markers*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1204937>
- [302] Trotta, E. (2014) . On the normalization of the minimum free energy of RNAs by sequence length. *PLoS ONE*, 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113380>
- [303] Wade, R.C. and Goodford, P.J. (1989) . The role of hydrogen-bonds in drug binding. *Progress in Clinical and Biological Research*, United States. 289, 433–44.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hasan ÖZ

Doğum Tarihi :

E-mail :

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2002-2006
Lisans	İşletme	Anadolu Üniversitesi	2011-2015
Yüksek Lisans	Kimya Öğretmenliği	Sakarya Üniversitesi	2006-2008
Yüksek Lisans	Analitik Kimya	Sakarya Üniversitesi	2009-2011
Doktora	Eczacılık Biyokimya	Mersin Üniversitesi	2018-2023

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

Görevi	Kurum	Yıl
Laboratuvar Müdürü	Mersin İl Halk Sağlığı Laboratuvarı	2017-Halen
Kalite Temsilcisi	Mersin İl Halk Sağlığı Laboratuvarı	2014-2017
Kalite Temsilcisi	Sakarya İl Halk Sağlığı Laboratuvarı	2011-2014
Teknik Personel	Sakarya İl Halk Sağlığı Laboratuvarı	2006-2011

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

1. ŞİŞMAN, İ., ÖZ, H., Preparation of SnTe thin films on Au(1 1 1) by electrodeposition route, Electrochimica Acta(56), 4889-4894, 2011.
2. ÖZ, H., Helal Kozmetikler ve Formülasyonda Kullanılabilecek Bileşenler, 3.Kozmetik Kimyası Kongresi, Antalya, 2013
3. ÖZ, H., Bitkisel İlaçlarda Kalite Sorunları, 1.İlaç Kimyası Kongresi, Antalya, 2013