

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLON KANSERİNDE ONKOGENİK MİKRORNA'LARIN
ARAŞTIRILMASI**

Sema ATMANOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2018**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KOLON KANSERİNDE ONKOGENİK MİKRORNA'LARIN
ARAŞTIRILMASI**

Sema ATMANOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2018**

Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ danışmanlığında, Sema ATMANOĞLUN'nun hazırladığı “**Kolon Kanserinde Onkogenik Mikrorna’ların Araştırılması**” konulu bu çalışma 24/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ

Üye : Doç. Dr. Hüseyin KAHRAMAN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Arif PARMAKSIZ

Bu Tezin Biyoloji Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 15160

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Kanser Nedir	4
2.2. Kolon Kanseri	5
2.2.1. Kolon kanserinin oluşumu.....	6
2.2.2. Kolon kanserinin risk faktörleri	8
2.2.2.1. Yaş.....	9
2.2.2.2. Aile öyküsü.....	9
2.2.2.3. Polipler	9
2.2.2.4. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisi.....	10
2.2.2.5. Genetik	10
2.2.2.6. Diyet	11
2.2.2.7. Sigara ve alkol tüketimi.....	12
2.2.2.8. Obezite ve diyabet	12
2.2.2.9. Çevresel faktörler ve diğer faktörler”1q.....	13
2.2.3. Koruyucu faktörler	14
2.3. Mikro RNA	15
2.3.1. miRNA’ların keşfi.....	15
2.3.2. miRNA’ların yapısı	16
2.3.3. miRNA’ların keşfi oluşumu	16
2.3.4. miRNA’ların fonksiyonu.....	18
2.4. Kanser ve miRNA	20
2.4.1. Tümör süpressör miRNA’lar	22
2.4.2. Onkogenik miRNA’lar	23
2.4.3. miRNA’ların Tümör süpressor ve Onkogenik Olarak işlevi	24
2.5. Microarray Yöntemi.....	26
2.5.1. Microarray teknolojisinin gelişimi	27
2.5.2. Microarray kullanım ve uygulama alanları	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Hasta seçimi	30
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Microarray yöntemi	30
3.2.1.1. Total RNA izalasyonu	31
3.2.1.2. RNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi.....	32
3.2.1.2.1. Nanodrop ölçümü	32
3.2.1.3. Elektroforez	33
3.2.1.2. Elektroforez ve jel hazırlanması	33
3.2.1.3. RNA örneklerinin agorez jele yüklenmesi.....	33
3.2.1.4. Poly (A) kuyruğunun eklenmesi	34
3.2.1.5. Flash tag biotin hsr ligasyonu aşaması	35
3.2.1.6. Hibridizasyon aşaması.....	36
3.2.1.7. Yıkama-boyama-tarama	37
3.2.1.8. Analiz	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	39
4.1. miRNA’nın 1290’nın Ekspresyon Profili.....	42

4.2. miRNA'nın 27'nin Ekspresyon Profili.....	43
4.3. miRNA'nın 18b'nin Ekspresyon Profili.....	44
4.4. miRNA'nın 196b'nin Ekspresyon Profili.....	45
4.5. miRNA'nın 224'ün Ekspresyon Profili.....	47
4.6. miRNA'nın 1292'nin Ekspresyon Profili.....	48
4.7. miRNA'nın 3180-3p'nin Ekspresyon Profili	50
4.8. miRNA'nın 191'in Ekspresyon Profili.....	51
4.9. miRNA'nın 543'ün Ekspresyon Profili	52
4.10. miRNA'nın 183'ün Ekspresyon Profili.....	54
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	56
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	66



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KOLON KANSERİNDE ONKOGENİK MİKRORNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Sema ATMANOĞLU

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Yıl:2018, Sayfa:66

Kolon kanseri, dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biridir. Kolon kanserinde, protein kodlamasına katılmayan fakat protein kodlayan genlerin protein ifadelerini düzenleyen, miRNA' ların rolü olduğu bildirilmektedir. MikroRNA' lar, hedef mRNA' nın moleküler yolağındaki özelliğine göre, tümör süpressör ve onkogenik özellik taşımaktadırlar. Son yıllarda mikroRNA' ların işlevlerinin ve kanser gelişimindeki rollerinin anlaşılmasıyla, hem kanserlerin moleküler patolojisinin anlaşılmasında hem de moleküler hedeflere yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi için umut oluşturmaktadır. Çalışmamızda, kolon kanserinde sağlıklı ve tümörlü dokularda onkogenik miRNA ekspresyonları ve bunların erken teşhis amacıyla kullanılabilme kapasiteleri araştırılmıştır. Kolon kanseri teşhisi konulmuş 6 hastadan alınan sağlıklı ve tümör doku örneği kullanılmıştır. Doku örneklerinden total RNA izolasyonundan sonra, mikroRNA ekspresyon seviyeleri microarray analiz sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Mikroarray analizleri sonucunda, kolon kanserinde onkogenik karakterli olabileceği düşünülen 10 adet mikroRNA (mir-224, mir-1290, mir-27a, mir-543, mir-18b, miR-3180-3p, mir-1292, mir-191, mir-196) belirlenmiştir. Belirlenen mikroRNA' ların sağlıklı dokulardakine oranla ile tümörlü dokularda ekspresyon seviyelerinin artmış olduğu gözlenmiştir. MikroRNA ekspresyon analizleri ile elde edilecek veriler, kolorektal kanserler için erken teşhis belirteci olarak kullanılabilme olanağı oluşturabilecektir.

ANAHTAR KELİMELER: Kolon Kanseri, MikroRNA, Onkogenik mikroRNA, MikroRNA Ekspresyonu, Mikroarray yöntemi

ABSTRACT

MSc Thesis

INCENTIVES OF ONCOGENIC MICRORNS IN COLON CARCINOMA

Sema ATMANOĞLU

**Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Faruk SÜZERGÖZ
Year: 2018, Page:66**

Colon cancer is one of the most common types of cancer in the world. It has been reported in colon cancer that the role of miRNAs, which do not participate in protein coding, but which regulate protein expression in protein-encoding genes. MicroRNAs carry tumor suppressor and oncogenic properties according to the molecular pathway of the target mRNA. In recent years, with the understanding of the functions of microRNAs and their role in the development of cancer, new expectations have emerged for both the understanding of molecular pathology of cancers and the development of new therapeutic approaches to molecular targets. In our study, oncogenic miRNA expressions in healthy and tumorous tissues in colon cancer and their capacity to be used for early diagnosis were investigated. Healthy and tumor tissue samples from 6 patients diagnosed with colon cancer was used. After isolation of total RNA from the tissue samples, microRNA expression levels were determined using a microarray analysis system. As a result of the microarray analysis, 10 microRNAs (mir-224, mir-1290, mir-27a, mir-543, mir-18b, miR-3180-3p, mir-1292, mir-191, mir-196) that are thought to be oncogenic in colon cancer have been identified. It has been observed that the expression levels of the identified microRNAs are increased in tumor tissues compared to healthy tissues. The data obtained with the analysis of microRNA expressions may be used as an early diagnosis marker for colorectal cancers

KEY WORDS: Colon cancer, MicroRNA, Oncogenic MicroRNA, Expression of microRNA, Microarray

TEŐEKKÖR

Tez alıőmamı ynlendiren ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen danıőmanım Sayın Prof. Dr. Faruk SÖZERGÖZ'e ve bu çalışmamızda maddi olarak destekte bulunan HÖBAK'a, ayrıca tez çalıőmamda bana yardımcı olan İbrahim ALTUNTAŐ, Emine TEKER, Özgür YÖKSEKDAĖ ve Hasine YEL'e teőekkÖr ederim. Son olarak, yÖksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen eőim İbrahim Halil ATMANOĞLU'na ve manevi desteğini her an hissettiğim oğlum Ali Asaf ATMANOĞLU'na teőekkÖrler.



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. 2001-05 arasında KRK tanısı alan ve KRK'ye bağlı ölen hastaların yaş aralıklarına göre dağılımı.....	7
Şekil 2.2. Kolon kanserinin risk faktörleri şemasal şekli	8
Şekil 2.3. miRNA yapısı	16
Şekil 2.4. miRNA oluşumu	18
Şekil 2.5. miRNA fonksiyonu.....	19
Şekil 2.6. miRNA'lardaki bozuklukların miRNA ve mRNA işlevine etkisi	20
Şekil 2.7. miRNA'ların işlevi.....	25
Şekil 3.1. Mikroarray cihazı	31
Şekil 3.2. Doku homojenizatör cihazı	32
Şekil 3.3. Elektroforez cihazı	33
Şekil 3.4. Agoroz jel görüntüsü.....	34
Şekil 3.5. Mikroarray çip.....	37
Şekil 4.1. Dendrogram	41
Şekil 4.2. miRNA-1290'nın normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	42
Şekil 4.3. miRNA-27a'nın normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	44
Şekil 4.4. miRNA-18b'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	45
Şekil 4.5. miRNA-196b'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	46
Şekil 4.6. miRNA-224'ün normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	48
Şekil 4.7. miRNA-1292'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	49
Şekil 4.8. miRNA-3180-3p'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	50
Şekil 4.9. miRNA-191 normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05).....	52
Şekil 4.10. miRNA-543'ün normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)	53
Şekil 4.11. miRNA-183'ün normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05).....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı.....	5
Çizelge 2.2. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Kadınlarda En Sık Görülen İlk Beş Kanserlerin Dağılımı.....	6
Çizelge 3.1. Poly (A) Tailing master mix	35
Çizelge 3.2. Ligasyon aşamasında kullanılan mix içeriği	36
Çizelge 3.3. Hibridizasyon kokteyl	36
Çizelge 3.4. Boyamada kullanılan solüsyonlar	38
Çizelge 4.1. Tümörlü ve normal dokuda onkogenik olarak eksprese edilen mikroRNA seviyelerinin karşılaştırılması	40

SİMGELER DİZİNİ

cDNA	Komplementer DNA
CRC	Kolon Kanseri (Kolorektal Kanser)
KRK	Kolorektal kanser
DNA	Deoksiribonükleik asit
miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
RNA	Ribonükleik Asit
FAP	Famlyal Adenomatöz Polipozis
HNPCC	Hereditör Nonpolipozis Kolorektal Kanser
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
COX-2	Siklooksijenaz-2
OD	Otozomal Dominant
LKB1	known as liver kinase B1
PTEN	Fosfataz ve Homolog Tensin
NSAİD	Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
RISC	RNA ile indüklenen susturma kompleksi
ORF	open rea-ding frame
RISC	RNA-induced silencing coplekx
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
TS	Tümörsupressör
Onco-miR	Onkogenik mikroRNA
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
RAS	Resistance to audiogenic seizures
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ATP	Adenizin Tri Fosfat
KIF13B	Kinesin Family Member 13B
ANOVA	Analysis of variance
SMAD4	SMAD family member 4
SFRP1	Secreted frizzled related protein 1
GATA6	GATA binding protein 6
CDH1	cadherin 1
p21	Activated Kinase-1
CKB	creatine kinase B
UBA2	ubiquitin-associated 2
ROS	transcriptional regülatör
C / EBP β	Growth arrest induced by
p53(Tp53)	Tümör protein 53
KLF4	Krüppel-like factor 4
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
KRAS	KRAS proto-oncogene
MTA1	Metastasis associated1
HMGA2	high mobility group AT-hook 2
IGKV1	İmmunoglobulin kappa chain variable 1
UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase family 2 member B4
RBP4	retinol binding protein 4
ADH4	alcohol dehydrogenase 4
RNase	Ribonuclease
*	İstatiksel Olarak Anlamlı
BIC	B cell İntegrasyon Cluster

1. GİRİŞ

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, sıklıkla görülmesi hastalık ve ölüm oranlarının yüksek olması, tedavisinin yüksek maliyetli olması, süresi ve yan etkileri sebebiyle büyük tehdit oluşturmaktadır. Kanser hastalığını tanımlayacak olursak; milyonlarca yıldır insanları öldüren, günümüzde ve önümüzdeki yıllarda da öldürmeye devamedeceği öngörülen çağımızın en ciddi sağlık problemleri arasında yer almaktadır. Sadece hastalığa yakalanan kişiyi değil aynı zamanda yakın çevresini de etkileyerek bir sosyal sorun olarak ortaya çıkmaktadır (İzmirli ve ark., 2007; Arslan, 2000).

Hücrenin çoğalma hızının artması, apoptozisin yavaşlaması veya ortadan kalkması sonucunda kontrolsüz şekilde hücre büyümesi ile ortaya çıkan süreç genel olarak “kanser” olarak adlandırılır. Kanser; hastaların fiziksel, psikolojik, manevi ve sosyal durumlarını etkileyerek kişisel yaşamında önemli değişimlere sebep olmaktadır (Kelleci, 2005; Lin ve ark., 2003). Kanser; kontrolsüz hücre büyümesi ve anormal biçimde yayılımı ile karakterize olan hastalıklar grubu arasındadır (Arslan, 2003).

Kolon kanseri, gastrointestinal sistemin en sık görülen kanseridir. Erişkinlerde kolon kanseri tüm kanser türlerinin yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır. Kolon kanseri kadın ve erkeklerde tüm kanser çeşitleri içerisinde üçüncü sırada yer alan kanser türüdür. Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında erkeklerde prostat ve akciğer kanserinden sonra kadınlarda ise meme ve akciğer kanserlerinden sonra üçüncü sıradadır. Kolon kanserine kadın ve erkeklerde eşit sıklıkta rastlanmaktadır.

Genetik ve çevresel etkenler kolon kanseri gelişim riskini artırmıştır. Kolon kanserinin görülme sıklığı yaşa bağlı olarak değişmektedir. 50 yaşından sonra hastalığın oluşma riski düzenli şekilde artar. Hastaların % 90 civarı 50 yaş üstüdür. Yüksek risk taşımayan vakalarda tarama yaşının 50 oluşunun nedeni budur (Tarhan ve Sarıcık, 2015). Kolon kanserinin görülme sıklığı 50 yaşından sonra belirgin olarak

artar ve her 10 yıl geçtikçe iki katına çıkar. 75 yaşına yakın ise en yüksek seviyeye ulaşır. Kolon kanseri risk faktörleri içerisinde diyet, genetik yatkınlık, ileri yaş, sigara, alkol, inflamatuvar barsak hastalığı ve çevresel faktörler gibi çeşitli etkenler yer alır.

MikroRNA (miRNA)'lar DNA üzerinde bulunan ekzon ve intron bölgeleri ile protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu gerçekleştiren ancak proteine dönüşemeyen 18-24 nükleotid uzunluğunda işlevsel RNA molekülleridir. miRNA'lar protein translasyon gelişiminin engellenmesi ile mRNA yıkımına sebep olurlar. Birçok çalışma mikroRNA'ların hematopoezinde farklılaşma, apoptoz ve çoğalma benzeri hücrel olaylarda hayati fonksiyonlara sahip olduklarını göstermiştir. Malign hastalardaki rolleri birden çok araştırmanın konusu olmaktadır. miRNA'ların hedefi bir veya birden fazla gen olabilir. Hedef aldıkları genlerin mRNA'larını baskılayarak gelişim, çoğalma, farklılaşma, ve apoptoz gibi hücrel olaylarda rol almaktadırlar. MikroRNA'ların hedef aldıkları genlerin % 50'sinden fazlası kanserle ilişkilendirilmiş genom üzerinde yer almaktadır. Yapılan bilimsel çalışmalar; mikroRNA'ların onkogen baskılayan bir gen sınıfı oluşturulabileceğini göstermiştir. Normal ve tümörlü dokular karşılaştırıldığında farklı düzeyde ekspresyon alan miRNA'lar belirlenerek, kanser hastalığının teşhis ve tedavisinde etkili olacağı düşünülen birden çok miRNA belirlenebilecektir.

Oligonükleotid miRNA mikroarray analizi günümüzde kanserde miRNA ekspresyon profilinin belirlendiği etkili bir moleküler tekniktir. Günümüzde miRNA'ların kanser ve normal dokularda farklı düzeylerde ekspresyon oldukları birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu farklılıklar tümör türüne özgüdür ve bazı türlerde prognozla ilişkilendirilmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda kolon kanseri ve normal kolon dokusunda onkogenik miRNA'ların belirlenmesi ve normal doku ile tümörlü dokudaki onkogenik miRNA seviyelerinin mikroarray tekniği kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Kolon kanseri patogeneğinde etkili olabilecek mikroRNAlar belirlenmeye çalışılmıştır. miRNAların hedef mRNA'larının

bioinformatik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kolon kanserinin histopatolojik özellikleri ve miRNA ekspresyon düzeyi arasındaki ilişki belirlenmeye çalışılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Kanser

Hücre döngüsü kontrol mekanizmaları çalışmadığında ve hücre apoptozis fonksiyonlarını yitirdiğinde kanserleşme sürecine geçer. Kanser vücuttaki hücrelerin kontrolsüz olarak aşırı şekilde çoğalması ve kontrolsüz şekilde çoğalan bu hücrelerin vücudun çeşitli bölgelerine dağılması olayıdır. Genellikle organizma gerekli gördüğü zaman hücreler çoğalır. Normal olarak çoğalan bu hücreler, organizmanın düzenli çalışmasını ve sağlıklı kalmasını sağlar. Organizmada ihtiyaçtan fazla hücre çoğalması görülüyorsa bu bölgede bir kitle oluşur ve bu kitle tumor (ur) olarak isimlendirilir. Oluşan kitleler selim (benign) veya habis (malign) tümör olabilir. Benign tümörler iyi huylu özellik gösterdikleri için kanser değildirler. Benign tümörler komşu doku ve vücudun diğer organlarına yayılma özelliği göstermezler. Nadiren zararlıdır. Benign tümörler genellikle vücuttan rahatlıkla alınabilirler. Habis (malign) ise kanserli tümör olarak isimlendirilir. Habis tümörler buldukları dokudan vücudun diğer doku ve organlarına geçerek buldukları yerde zarara neden olurlar. Kanserli hücreler buldukları dokudan ayrılabilir, dolaşıma karışabilir veya lenf yollarına geçebilirler. Kanserli hücrelerin yayılması ve vücudun farklı bölgelerinde tümörün oluşması bu şekilde gerçekleşir. 100'den fazla değişik türde kanser çeşidi vardır. Bu kanser türleri vücudumuzun herhangi bir bölgesinde oluşabileceği gibi rektum ve kolon üzerinde de görülebilir.

2.2. Kolon Kanseri

Kanser bütün dünya üzerinde genellikle artış gösteren bir hastalık türüdür. Günümüzde kanser toplum ve bireyler arasında hem manevi hemde sosyoekonomik yönden kayıplara ve birden çok probleme neden olmaktadır. Dünya üzerinde toplamda 14,1 milyon kişide gelişmiş yeni kanser vakası ve bunlar içerisinde 8,2 milyon kişi kanser hastalığından ölmüştür. Kanser, dünyada ve ülkemizde nedeni bilinen ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıralarda yer almaktadır (Anonim, 2017a). Kanserde benzer gidişat sürdüğü takdirde 2030'lu yıllarda ortalama her yıl 22 milyon yeni kanserli vakanın oluşması beklenmektedir. Bu oluşacak olan yeni kanserli vakalar 2008 yılı verileri ile karşılaştırıldığında % 75 civarında artış olacağı düşünülmektedir (Anonim, 2017a). Gelecekte oluşacak yeni kanserli vakaların bir çoğunun az gelişmiş ülkelerde meydana gelmesi beklenilmektedir (Ferlay ve ark., 2012). Dünya üzerinde 100'den fazla değişik türde kanser çeşidi vardır. Bu kanser türleri vücudumuzun herhangi bir bölgesinde oluşabileceği gibi rektum ve kolon üzerinde de görülebilir. Kolon kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında 3.sırada görülen bir kanser türüdür. 1 yılda yaklaşık 1 milyon insanda görülmekte ve 500 bin kişinin ölümüne sebep olmaktadır (Luk, 1999). Dünya üzerinde ve ülkemizde gastrointestinal sistemin en çok görülen kanser türüdür (Tarhan, 2015). Kolorektal kanser erkeklerde (Çizelge 2.1) ve kadınlarda (Çizelge 2.2) 3. sırada yer alır. Kolorektal kanser erkeklerde yüz binde 22,8 sıklıkla görülürken kadınlarda yüz binde 13,8 sıklıkla görülür (Anonim, 2018a).

Çizelge 2.1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Erkeklerde En Sık Görülen İlk Beş Kanser Türünün Dağılımı

	Türkiye*	Dünya	IARC'a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
1	Akciğer	Akciğer	Prostat	Prostat	Prostat
2	Prostat	Prostat	Akciğer	Akciğer	Akciğer
3	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal
4	Mesane	Mide	Mide	Mesane	Mesane
5	Mide	Karaciğer	Mesane	Böbrek	Böbrek

Çizelge 2.2. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) Tarafından Yayınlanan Globocan 2012 Verilerine Göre Kadınlarda En Sık Görülen İlk Beş Kanserlerin Dağılımı

	Türkiye*	Dünya	IARC'a üye 24	AB (28 ülke)	ABD
1	Meme	Meme	Meme	Meme	Meme
2	Tiroid	Kolorektal	Kolorektal	Kolorektal	Akciğer
3	Kolorektal	Uterus serviksi	Akciğer	Akciğer	Kolorektal
4	Uterus korpusu	Akciğer	Uterus serviksi	Uterus korpusu	Tiroid
5	Akciğer	Uterus korpusu	Uterus korpusu	Uterus serviksi	Uterus

2.2.1. Kolon kanserinin oluşumu

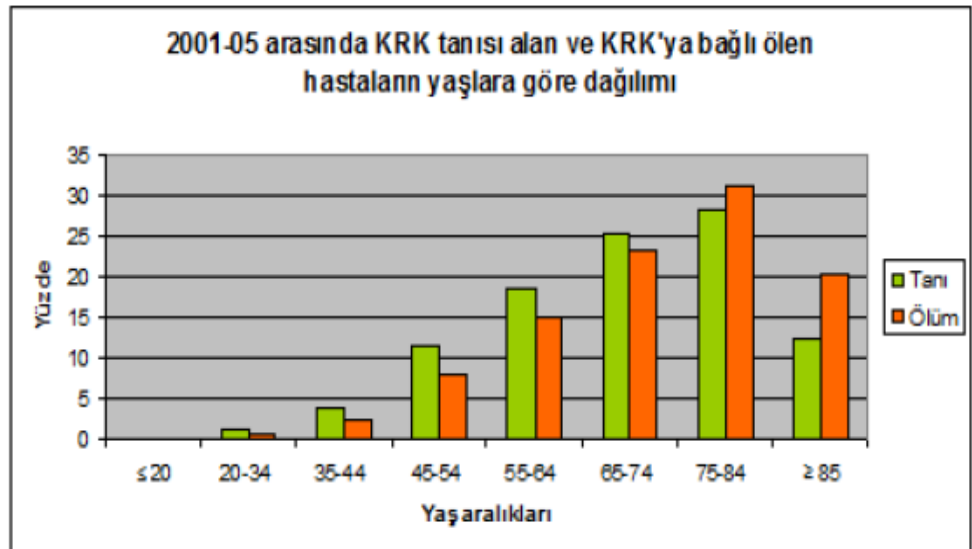
Kolon kanseri, gastrointestinal sistemin en çok rastlanan kanseridir. Kolon kanserinin oluşumu ayrıntılı olarak araştırılmış ve detaylı olarak ortaya konmuştur. Kolon kanseri bağırsak içi duvarında iyi huylu küçük polipler şeklinde oluşmaya başlar (Anonim, 2016). Polip, bağırsağın iç yüzeyini örten tabakadan oluşan ve bağırsak içine doğru büyüyen kabartı şeklinde olan şişliğe verilen isimdir. Zaman içinde, polibi oluşturan hücrelerde değişimler meydana gelir. Polipler giderek büyür ve kanser kitlesi haline gelir ve oluşan kitle kalın bağırsak duvarını işgal eder. Kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam eden kanserli hücreler belli bir dönem sonra bağırsakta tıkanıklığa yol açabilir (Kuzu, 2015). Tüm bu süreç 10-15 yıl içinde yavaş yavaş gelişir. Ardından iyice büyüyen tümör bağırsak katlarını geçerek vücuda yayılır (Anonim, 2016).

Kolon kanseri; genetik yatkınlık, ileri yaş ve çevresel faktörler gibi sebeplerle gelişebilmektedir. Kolon kanserinin görülme sıklığı yaşa bağlı olarak değişmektedir. 50 yaşından itibaren hastalığın oluşma riski düzenli şekilde artar. Hastaların % 90 civarı 50 yaş üstüdür. Yüksek risk taşımayan vakalarda tarama yaşının 50 oluşunun nedeni budur (Tarhan, 2008). Kolon kanserinin görülme sıklığı 50 yaşından itibaren belirgin şekilde artar ve her 10 yıllık dilimde iki katına çıkar. 75 yaşına yakın ise en yüksek seviyeye ulaşır. Kolon kanserinin nedenleri tam olarak belirlenmemiştir ancak oluşumunda etkisi olduğu düşünülen birtakım genetik ve çevresel faktörler mevcuttur. Aile öyküsünde kolon kanseri bulunan kişilerin kansere yakalanma riski kalıtsal yatkınlığı olmayan bireylere oranla fazladır. Ek olarak, yumurtalık ile meme

kanseri geçirmiş kişilerin ve ailelerinin kolon kanserine yakalanma ihtimali normalden yüksektir (Anonim, 2017b).

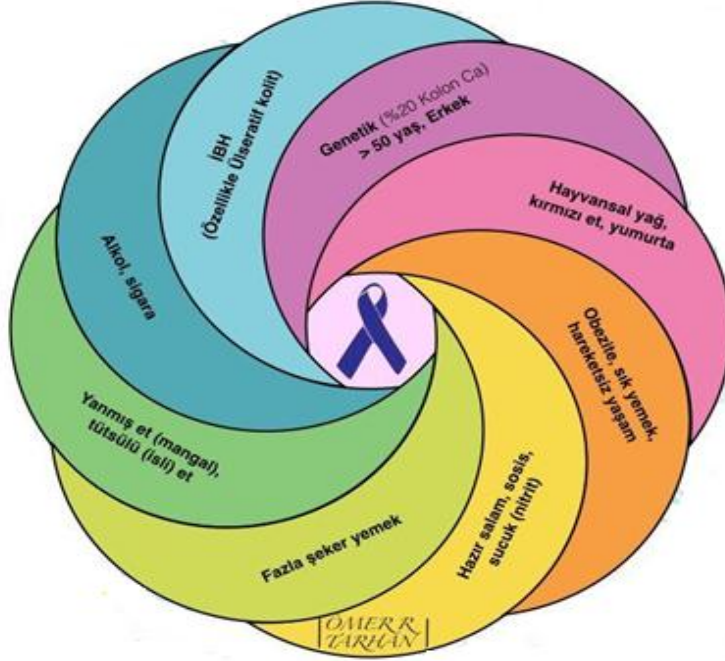
Genetik çalışmalarda kolon tümörlerinin yaklaşık % 10'nun kalıtsal olarak yatkınlık gösteren bireylerde geliştiği belirlenmiştir. Ailesel polipozis, Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı gibi sendromlar taşıyan bireyler kalıtsal benzerlik gösterdikleri durumlarda kanser çok erken yaşta nüks eder üstelik hastalığın seyri normalden kötüdür. Ayrıca, kolon kanserinde genetik eğilimi artıran durumlarda baskın olarak geçen Familial Adenomatöz Polipozis (FAP) ile Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser (HNPCC) sendromlarındandır (Edwards ve ark., 2006).

Eskiye bakıldığında kolon kanserinin lokalizasyonu sağa doğru yönelmiştir. Bu yönelim sigmoidoskopi ve polipektominin daha fazla uygulanması ile rektum ve sigmoid kolon kanserlerinde azalış göstermesiyle açıklanır (Şekil 2.1). Amerika'da ve birçok batı ülkesinde 1980'lerden sonra kolon kanserinden kaynaklı ölümler azalmaktadır. Bunun nedeni ise kolonda oluşan poliplerin erken dönemde tespit edilmesi ve endoskopik yardımıyla ortaya çıkarılması, kolon kanserinin erken evresinde teşhis konulması, daha etkili tedavi tekniklerinin katkısı bulunmaktadır.



Şekil 2.1. 2001-05 arasında KRK tanısı alan ve KRK'ye bağlı ölen hastaların yaş aralıklarına göre dağılımı

2.2.2. Kolon kanserinin risk faktörleri



Şekil 2.2. Kolon kanserinin risk faktörleri şemasal şekli

Kolon kanserinin oluşum nedenleri tam anlamıyla belirlenmemiştir. Araştırmalar, birçok risk faktörünün kolon kanseri olma ihtimalini yüksettiğini göstermiştir (Şekil 2.2). Kolon kanserlerinin % 95'ni polipler oluşturur. Bağırsağın iç yüzeyini döşeyen polipler mukoza olarak isimlendirilen yapılardan çıkan minik tomurcuklardır. Birçok polip iyi huylu olup kansere dönüşmez, fakat kolonoskopi yardımıyla alınmaları, kolon kanserini bariz şekilde azaltmaktadır. Bu yüzden kolon kanseri önlem alınabilecek bir hastalıktır (Anonim, 2017c).

Normalde polipler 50 yaş civarında bulunan kişilerin yaklaşık % 20'sinde vardır. Yaşın ilerlemesiyle birlikte poliplerin görülmesinde çok sayıda artış yaşanır. Vucutta oluşan poliplerin kanserleşmesi 8 yılda olduğu tahmin edilmektedir. Bu süreç oluşabilecek hastalığa tanı koymak için tarama testlerinin zamanını ve sıklığını belirleme konusunda fayda sağlamıştır (Anonim, 2014).

Çalışmalar sonucunda risk faktörlerinin kolon kanserinin gelişimini etkilediği belirlenmiştir. Bu faktörler arasında başta inflamatuvar bağırsak hastalığı olmak üzere beslenme, aile öyküsü, genetik yatkınlık gösteren hastalıklar ve çevresel faktörler söylenebilir (Kuşakçioğlu, 2003; Gönen, 2004).

2.2.2.1. Yaş

Kolon kanserine yakalanma riski yaş ilerledikçe artar. Bu hastalığa yakalananların % 90'ından fazlasına teşhis özellikle 50'li yaşından itibaren konulmuştur. Ortalama teşhis yaşı 72 olarak kabul edilir. Ancak ailede daha önceden kolon kanseri öyküsü var ise hastalığın daha erken yaşta görülme riski artar. (Kuşakçioğlu, 2003; Gönen, 2004).

2.2.2.2. Aile öyküsü

Kolon kanseri öyküsü görülen kişilerin (üstelik kanser erken yaşta olmuşsa) yakın akrabalarda özellikle (anne-baba, kardeş veya çocuklarda) bu hastalığa yakalanma riski yüksektir. Şayet yakın akrabaların bir çoğunda kolon kanseri geçmişi var ise bu bireylerde kolon kanseri riski katlanarak artmıştır (Anonim, 2014).

2.2.2.3. Polipler

Polipler kalın bağırsağın iç duvarından kaynaklanır. Polip, bağırsak iç yüzeyini örten tabakadan oluşan, bağırsak içine doğru büyüyen kabartı şeklinde olan şişliğe verilen isimdir. 50 yaşından sonra daha yaygın görülür. Başlangıçta iyi huylu tümör olmalarına rağmen zaman geçtikçe bu iyi huylu tümörlerin kansere dönüşme ihtimalide oluşabilir. Kalın barsağın polip gelişimine olan kalıtsal yatkınlığı, kolorektal kanserin oluşması riskini artırdığı belirlenmiştir. Kanserleşme riski sebebiyle poliplerin kolonoskopi yöntemiyle alınmalı ve sık sık hastarın kontrolü yapılmalıdır. Poliplere erken sürede teşhis konulması ve oluşan poliplerin alınması, kolon kanserine yakalanma riskini azaltır (Yokuş ve ark., 2012).

2.2.2.4. İnflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisi

Yaklaşık 10 yıl inflamatuvar bağırsak hastalığı (Ülseratif kolit veya Crohn gibi) geçirmiş bireylerin kolorektal kanserlere yakalanma riski yaklaşık 2 ile 3 kat artar. Ülseratif kolit ile kanser arasında bulunan ilişki hastalığın kolon bölgesindeki uzunluğu, aktivitesi ve süresiyle ilişkilidir (Ekbom ve ark., 1990). Ülseratif kolit için kullanılacak tedaviler kolorektal kanser gelişim riskini azaltmaktadır (Ekbom ve ark., 1990). Genç yaşta Crohn hastalığı görülen bireylerde CRC riski çok daha yüksektir. Crohn sebebiyle CRC'ye yakalanan bireylerin % 50'sinde crohn hastalığı bulunmayan kısımlarda CRC'nin görüldüğü ve yayıldığı belirlenmiştir (Dobrucalı, 2003).

2.2.2.5. Genetik

Kolon kanserinin miRNA'ların aktive ve inaktive şeklinde sentezlenmeleri sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Hastalığın oluşumuna neden olan birden fazla kalıtsal bozukluk tanımlanmıştır. Bütün kolon kanseri vakalarının % 5 kalıtsal geçiş gösterir (Vasen ve ark., 1999). Güncel çalışmalarda kolon kanserinin kalıtsal olarak belirlenmiş iki tipi bulunmaktadır. Bunlar ailesel adenomatöz polipozis sendromu (FAP) ile kalıtsal nonpolipozis kolorektal kanseridir (HNPCC).

FAP ve HNPCC ailesel kolon kanseri sendromları olmalarına karşın bütün CRC vakalarının sadece % 5'ini oluşturmaktadırlar (Vasen ve ark., 1999). HNPCC'i sporadik kanserlerden ayıran özellik hastalık erken yaşta nüks eder ve başta kolonun sağ tarafına yerleşmektedir (Christine ve ark., 2005). HNPCC'yi "Ailesel Adenomatöz Polipozis Sendromun"dan (FAP) ayıran özellik ise bu hastaların FAP' ta olduğu gibi çok sayıda polip oluşmaz (Christine ve ark., 2005). Hastalığın HNPCC kaynaklı olduğunu söylemek için çeşitli kriterlerden faydalanılır. Bunlar, aile öyküsünde en az 3 kişiye kesin olarak CRC tanısı konulmuş olmalı ve bunlar 1. dereceden yakın akraba olmalı, iki veya daha fazla nesilde görülmüş olması ve 50 yaşından önce iki veya daha fazla kişiye ailevi CRC tanısı konulmuş olmalıdır.

Ailesel polipozis koli (FAP), otozomal dominant olarak geçer. Bütün kolonda birden fazla adenomatöz polip oluşmasıyla gelişen bir hastalıktır. Tüm kolon kanselirinin % 0.5'nin FAP kaynaklıdır. Adenomatöz Polipozis Koli (APC) geni mutasyonludur. APC geni 5q21'e yerleşmiş bulunmaktadır. Çoğunlukla yaşamın ikinci on yıllık diliminde kendini gösterir. FAP'dan kaynaklı olduğunu söylemek için 100 veya daha fazla polip belirlenmelidir. Erken teşhis ile belirlenip tedavi edilmez ise sürekli kalın barsakta bir veya birden çok karsinom gelişebilir. Çoğu karsinom hayatın üçüncü on yılında başlayacağından korunma amaçlı yapılacak işlemler (Ploflaktik kollektomi) en geç 20 ile 25 yaşları arasında yapılmalıdır (Spirio ve ark., 1993; Meyskens ve ark., 2008).

Ailesel adenomatöz polipozis (FAP) sendromu taşıyanların ilerleyen yaşlarda kanser gelişme ihtimali % 100'e yakındır. Bundan dolayı kalın bağırsak tarama testlerine 10 yaşında başlanmalıdır. Ayrıca mide ve duodenumda endoskopi yöntemiyle taranmalıdır. Buna ek olarak tanı konulduğunda, koruma amacı ile kalın bağırsağın tamamını almak gerekmektedir. Cerrahi bir işlemle ince bağırsak anüse bağlanır ve hastaların yaşam kalitesinin aynı şekilde devam etmesi sağlanmaya çalışılır.

2.2.2.6. Diyet

Kolon kanserine, diyetinde yağ miktarı düşük olan toplumlarda daha az rastlanmaktadır. Batı ülkelerinde kolon kanseri görülme oranı yüksek olduğundan bu ülkelerde ortalama yağ miktarı, toplam kalorinin % 40-50'sini oluşturmaktadır. Kolon kanseri düşük oranda görülen toplumlarda ise toplam kalorinin sadece % 10-15'ini oluşturmaktadır. Yüksek yağ barındıran besinlerin tüketimi ile karaciğer kolesterol ve safra aside sentezini artırır. Safra asitleri ile serbest yağ asitlerinin kolon mukozasında tahrip oluşturduğu ve epitel hücrelerin çoğalmasını teşvik edip artışlarına neden olduğu gösterilmiştir. Beyaz et tüketimi yerine kırmızı et tüketiminin fazla olması kolon kanseri artış hızıyla ilişkili bulunmuştur (Gönen, 2014). Meyve ve sebzeden fakir beslenmek de kolon kanseri riskini artırır. Yağ oranı düşük olan balık ve kümes hayvanları gibi ürünlerin tüketimi tavsiye

edilmektedir. Lif oranı yüksek besinler, yeşil yapraklı sebzeler ve meyvelerin içerdiği vitaminler antioksidan kaynağı olup kolon kanserinin oluşuma riskini engellemektedir. Ströhle ve ark. (2007) çalışmalarında günlük 800 gr'dan daha fazla meyve ve sebze tüketen grup ile 200 gr'dan daha az bu besinleri tüketen grup karşılaştırıldığında kolon kanseri artış hızında azalma saptanmış (Ströhle ve ark., 2007). Çok az çalışmada A ve C vitamini bakımından zenginleştirilmiş diyetin kolon kanserinden korunmada antioksidan etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Ströhle ve ark., 2007). D vitamini kolon kanserinin gelişimini önlediğine dair çalışmalarda bulunmaktadır. Kalsiyum ile vitamin D büyük ihtimalle birlikte hareket ederler bu birliktelik sonucunda kolon kanserinin nüks etme riski azalmıştır (Yıldız, 2008).

2.2.2.7. Sigara ve alkol tüketimi

Tütün kullanımı kolon kanseri riskini büyük ölçüde arttırmıştır. Sigara kullanım yaşının erken olması ve yıl içerisinde tüketilen miktarı kanserin oluşma riskini artırır (Botteri, 2008). Alkolün çok az miktarda alınımı bile kansere yakalanma riskini arttırabilir. Alkol tüketen tüm bireylerde kanser oluşmayabilir. Fakat bilim insanlarının yaptıkları çalışmalarda genellikle bazı kanserlerin alkol kullanan kişilerde kullanmayanlara oranla çok daha yaygın olabileceğini göstermiştir. Alkol ile sigaranın beraber tüketimi çok daha kötüdür (Anonim, 2015).

2.2.2.8. Obezite ve diyabet

Obezite iskemik kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, hipertansiyon, meme, endometriyum, over, prostat ve kolon kanseri gibi yaşamı tehdit eden hastalıklar için bir risk faktörüdür (Bahçeci ve ark., 2009). Kadınlarda kanser ölümlerinin % 20'sine erkeklerde ise % 14'ne obezite ve kilolu olma sebep olmaktadır. Obezite ve diyabet özellikle, kolorektal, meme, pankreas, endometriyum, renal ve karaciğer kanser riskini arttırmaktadır (Balkan ve ark., 2015).

Bilimsel çalışmalarda vücut kitle indeksi 40 kg/m² üzerinde olan kişilerde kolon kanserinin oluşma riski, normal ağırlığa sahip kişilere oranla çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Anonim, 2017d).

Tip 2 (insülin bağımlı olmayan) diyabet hastalarında kolorektal kanser gelişme riski yüksektir. Aslında her 2 hastalığın aşırı kilo ve obezite gibi ortak risk faktörleri vardır. Ancak bu yüksek risk ortak faktörlerden bağımsız olarak da mevcuttur ve Tip 2 diyabet hastalarında tanı sonrası tedavi sonuçları da biraz daha kötüdür (Anonim, 2018b).

Yapılan bir çalışmada kolon kanseri ile obezite arasındaki ilişkiyi irdeleyen ve önemli görülen hipotezlerden biri; obeziteye yakalanan bireylerde insülinin yüksek olması ve insülin bağımlı büyüme faktörlerinin tümör gelişimini desteklediğine dairdir (Dönmez ve ark., 2012).

2.2.2.9. Çevresel faktörler ve diğer faktörler

Kanserden korunmada beslenme alışkanlıkları ile çevresel faktörlerin olumlu şekilde ilerlemesi önemli görülür. Birçok bilimsel veri meyve ve sebze ağırlıklı diyetin mide, akciğer, meme, kalın bağırsak, pankreas, yemek borusu ve gırtlak kanserleri gibi birçok kanser türünü önlediğini göstermiştir. Sebze ile meyvelerin posalı yapıları ve içermiş oldukları antioksidan bileşiklerden dolayı koruyucu etki gösterdikleri belirlemiştir (Yokuş ve ark., 2012).

Asya, Güney Amerika Afrika ve Afrika gibi kolon kanserinin az görüldüğü bölgelerden, kolon kanserinin sık görüldüğü bölgelere göç edenlerde kolon kanseri görülme sıklığının göç ettikleri bölgede yaşayanların düzeyine çıkması, çevresel faktörlerin etiolojide önemli rolü olduğunu göstermektedir. Çok az sıklıkta kolon kanseri görülen Japonya'dan ABD'ye göç edenlerde kolon kanseri görülme riskinin 2,5-3 kat arttığı belirlenmiştir (Norat ve ark., 2005).

- Akromegalia kolon karsinomu ile adenom riskini arttırmıştır. Genç akromegalialarda kolonik neopaziler daha çok bulunmaktadır.
- 2-38 yıl sonrasında üreterosigmoidostomide adenoma gelişebilir (Stewart ve Ark., 1982).
- CRC ile yetersiz Hodgkin lenfoma tedavisi arasında risk varlığı belirlenmiştir.
- Yapılan çalışmada prostat kanseri için RT alan hastalarda rektum kanseri hızında artış görülmüştür (Baxter ve Ark., 2005).
- HIV (+) hastalarda kolon kanser insidansında artış saptanmıştır (Benni ve Ark., 2006).
- Uterus, yumurtalık ve meme kanserlerinden sonra CRC gelişme riski iki kat artış saptanmıştır (Rosen ve Ark., 1986).

2.2.3. Koruyucu faktörler

- 40 yaşından sonra düzenli olarak dışkıda gizli kan testi (yılda en az bir kez), kalın bağırsak röntgeni, 5 yılda bir sigmoidoskopi, 10 yıllık aralıklarla kolonoskopi yada sanal kolonoskopi gibi tarama testlerinin yaptırılması fayda sağlayacaktır.
- Ailerinde kalın bağırsak polipi yada kolon kanseri öyküsü bulunanlar için genetik danışmanlık gereklidir.
- Hergün düzenli şekilde 30-60 dakika spor yapmak CRC riskini % 40 oranında düşürür.
- Kalsiyum, vitamin D ve folik asit barındıran multivitaminleri düzenli kullanmak.
- Kadınlarda menapoz sonrası hormon (Östrojen ve progesteron) tedavisi görmesi (Chlebowski ve ark., 2004).
- Sigara ve alkolden uzak durmak fayda sağlayacaktır.
- Diyet içerisinde yüksek miktarda posa içeren meyve, sebze, baklagiller, süt ve aşırı yağ içeren gıdalardan uzak durulması, beyaz et tüketilmesi ve kırmızı et tüketiminin ise en çok bir avuç büyüklüğünde olması CRC riskini % 40 azaltır.
- Probiyotik içeren gıdaların tüketilmesi. Bağırsakta bulunan yararlı bakterileri çoğaltmak, bağırsak kanserini önlediklerine dair çok az sayıda çalışma olmakla beraber, bu etki bilimsel açıdan tam bir kesinlik kazanmamıştır.
- Düşük miktarda magnezyum alımının rektum ve kolon kanserinde koruyucu etkisinin olduğu belirtilmiştir (Larsson ve ark., 2005).

- Fiziksel aktivite olmadan dahi kilo veren kişilerde CRC hızında hem kadınlarda hem erkeklerde azalış belirlenmiştir (Wolin ve ark., 2009).
- Folat desteği, selenyum desteği, diyetle fiber desteği ve vitamin B6 (piridoksin) desteğinde yararlıdır.
- Aspirin ile diğer NSAİD'lerin etki mekanizmaları tam anlamıyla bilinmemesine rağmen siklooksijenaz 2 inhibisyonu ile apoptozun artışı ve tümürlü hücrelerin büyümesini azaltmaya çalışarak etki göstermektedir (Thun ve ark., 1991).

2.3. miRNA

İnsan genomunda bulunan DNA'nın büyük bir kısmı, RNA'yı kodlamasına rağmen genomun çok küçük bir bölümü (yaklaşık % 1.5) fonksiyonel proteinlerin sentezlenmesinde görev almaktadır. Yakın döneme kadar genomun çok küçük olan bölümünün çok az önem taşıdığı düşünülmekteydi. Ancak bu görüş küçük RNA moleküllerin keşfiyle ortadan kalkmış. Bu grupta bulunan miRNA'lar yüksek seviyede korunan, genom üzerindeki protein kodlayan intron ve/veya ekzon bölgelerinden RNA sentezleyen genlerden sentezlenen fakat proteine dönüşmeyen RNA molekülleridir.

2.3.1. miRNA'ların keşfi

miRNA'lar genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ile protein kodlayamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkripsiyonu gerçekleşen, ancak proteine translasyonu gerçekleşmeyen, fonksiyonel RNA molekülleridir. İnsan genomu üzerinde miRNA'ların kodlanmasını sağlayan yüksek seviyede korunan yüzlerce gen bölgesi keşfedilmiştir (Shenoouda, 2009).

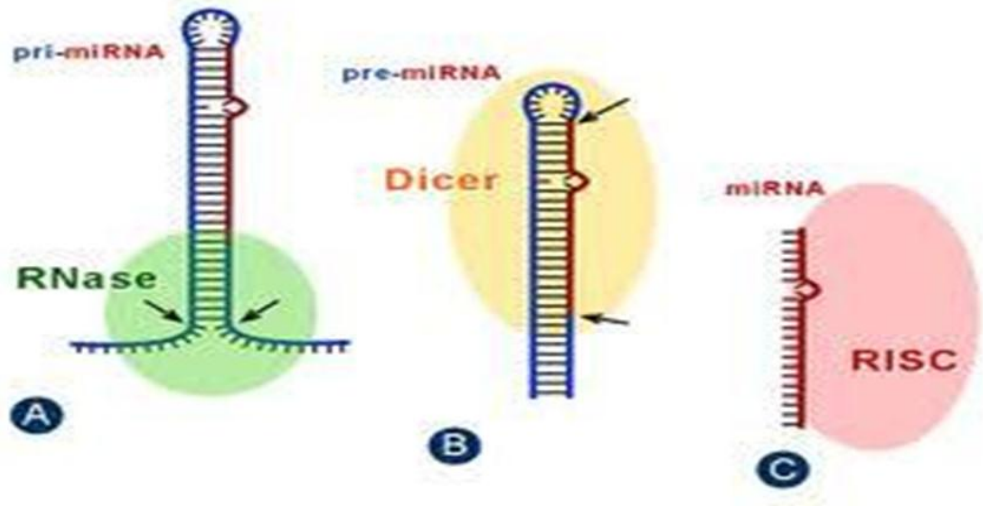
Şu an itibariyle, miRbase (<http://www.mirbase.org>) sayfasında en son açıklanan verilerine göre insanda 38589 adet miRNA tanımlanmıştır.

İlk olarak miRNA'lar, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında yuvarlak solucanda (*Caenorhabditis elegans*) lin-4

olarak adlandırılan genin herhangi bir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkripsiyonuyla tespit edildi (Lee ve ark., 1993; Wightman ve ark., 1993). Fakat belirlenen genetik materyale mikroRNA tanımı ilk defa 2001 yılı itibari ile kullanılmaya başlanmıştır (Lee, 1993).

2.3.2. miRNA'ların yapısı

miRNA'lar yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda tek iplikli RNA molekülü çeşididir. Pre-miRNA olarak isimlendirilen primer transkriptler işlenerek, başta pre-miRNA adlı kısa sap-ilmik yapısına daha sonradan ise fonksiyonel miRNA'ya dönüşürler (Şekil 2.3) (Lagos, 2001).



Şekil 2.3. miRNA yapısı

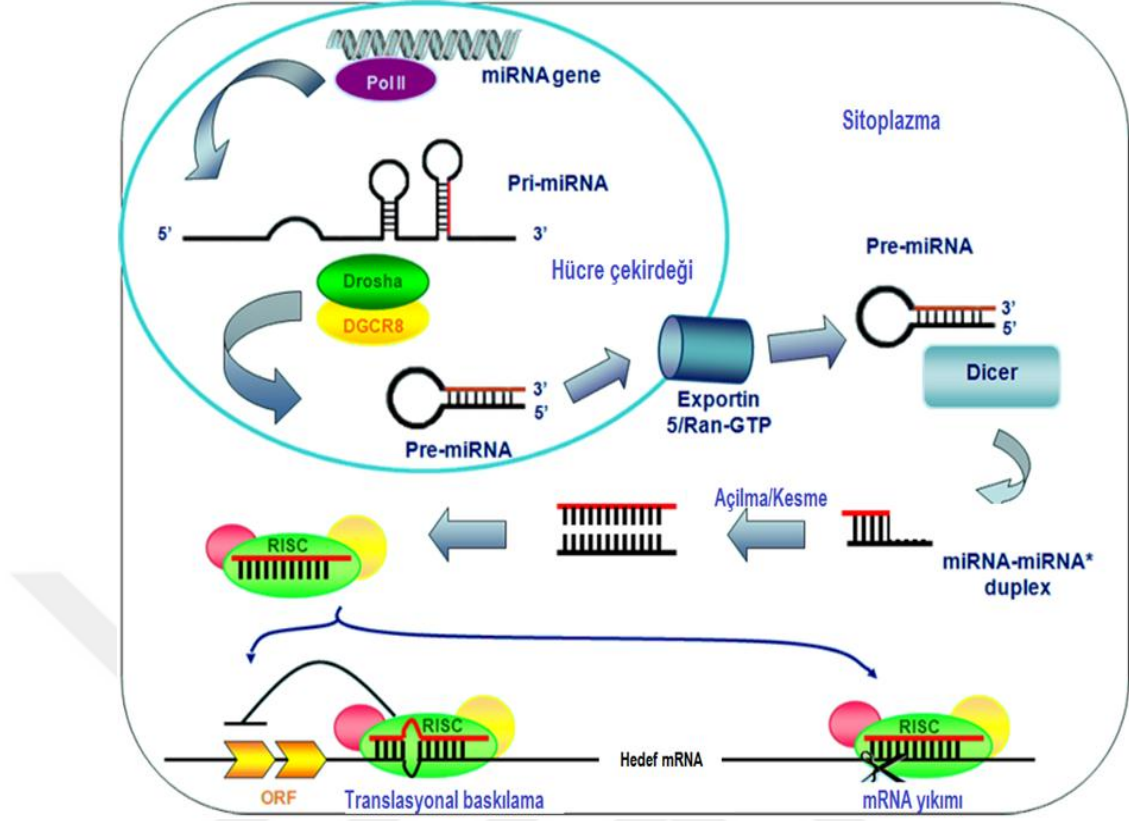
2.3.3. miRNA'ların oluşumu

MicroRNA'lar, birbirini takip eden üç adımlık işlem sonucu oluşurlar.

1. Birinci adımda miRNA genlerinden primer miRNA'ların transkripsiyon işlemi gerçekleşir.
2. İkinci adım ise pri-miRNA'lar çekirdek içerisinde pre-miRNA (prekürsör miRNA)'ya dönüştürülür.
3. Son adımda ise çekirdek içerisinde çıkan miRNA'ların sitoplazmada oluşumu gerçekleşir.

MikroRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi yardımıyla genomik DNA üzerinden sentezlenirler. Pri-miRNA (500-3000 baz), cap ve poli A kuyruğuna sahip sap-ilmik yapıdadır (Şekil 2.3) (Hayes ve ark., 2014). Çekirdek içerisinde pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (veya DGCR8), tarafından yaklaşık 70 nükleotitlik uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (Hayes ve ark., 2014). Endonükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA'yı bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) olarak isimlendirilir (Esquela, 2006).

Pre-miRNA molekülü bir çekirdek taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı olarak sitoplazma içerisine taşınır. Daha sonrada, pre-miRNA'lar sitoplazmada bulunan RNAaz III enzim ailesinden Dicer adı verilen endonükleazla kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA'ya dönüştürülür (Lund ve ark., 2004). Dicer, aynı anda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksinin (RISC) oluşumunda başlatır. Pre-miRNA'nın sap-ilmigi Dicer tarafından kestikten sonra, miRNA dubleksinden yalnızca biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içerisinde bulunan bir RNAz olan argonaute'un yardımıyla bu iki iplikten 5'ucu daha kararlı olanı seçip kompleks içerisine dahil eder. Komplekse dahil edilen iplik, kılavuz iplik olarak isimlendirilir. Diğer ise, antikılavuz veya yolcu iplik olarak isimlendirilir ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. miRNA'lar, aktif RISC'e dahil olduktan sonra iki şekilde etki gösterirler. Bunlar ya argonaute proteinleri yardımı ile mRNA'nın yıkımına neden olurlar ya da protein translasyonunun baskılanmasına sebep olurlar (Gregory ve ark., 2005).



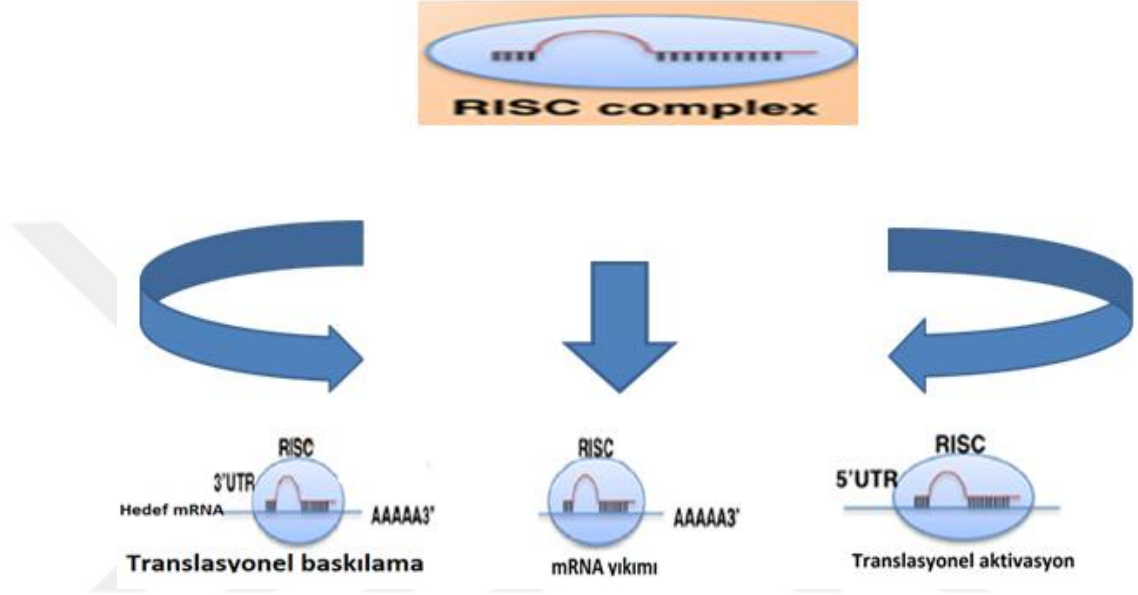
Şekil 2.4. miRNA oluşumu

2.4.2. miRNA'ların fonksiyonu

MikroRNA'lar hedef aldıkları genlerin ekspresyonlarını azaltıp protein sentezinin düzenlenmesine yardımcı olurlar. miRNA'ların kendine uygun nükleotid dizilerini ve komplementer hedef genleri tanıma özelliği vardır. miRNA'lar, RISC ile birleşerek kompleks oluştururlar, baz eşleşme özelliğiyle ise mRNA'ya bağlanırlar ve sonrasında protein translasyonunun baskılanmasına ve/veya mRNA'nın yıkımına sebep olurlar (Rothschild, 2014).

miRNA, hedef aldıkları mRNA'nın 3'ucundaki translasyon gerçekleşmeyen bölgeye veya hedeflediği mRNA'nın ORF kısmına bağlanır. Bağlanma pozisyonu miRNA komplekslerinin mRNA'ya nasıl komplementer olduklarına bağlıdır. miRNA'lar eğer mRNA'nın 3' UTR bölgesine bağlanma gerçekleştirirse kusurlu, eksik veya tam olmayan komplementerlik oluşur ve bunun sonucunda translasyonun inhibisyonu gerçekleşir. ORF bölgesinin içine doğru bağlanma gerçekleşir ise

kusursuz, tam komplementerlik oluşur ve Ago2 tarafından mRNA'nın yıkımı gerçekleşir. Ayrıca, her bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonlarını düzenleye bildiği ve her bir mRNA'nın da birden fazla miRNA tarafından hedef alınabileceği gösterilmiştir (Şekil 2.5) (Hayes ve ark., 2014).



Şekil 2.5. miRNA fonksiyonu.

Her bir miRNA hedef genlerin yüzlercesini kontrol ederek farklı biyolojik süreçleri düzenler. miRNA'lardaki bozuklukların mRNA'yı işlevini etkileyerek genetik ve epigenetik değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 2.6). Ayrıca poliferasyon, morfogenez, apoptoz ve farklılaşma gibi birçok hücrel aktivite miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. miRNA mutasyonu ya da yanlış ekspresyonun değişik insan kanserleriyle ilişkili olduğu miRNA'ların tümör süpressör ya da onkogen olarak fonksiyon gösterebildiği bilinmektedir (Karagün ve ark., 2014).

	Bozukluk	miRNA işlevi	mRNA işlevi
Genetik değişiklikler			
Delesyon	İfadenin azalması	↓	↑
Amplifikasyon	İfade artışı	↑	↓
Translokasyon	Normalden farklı ifade	↑↓	↑↓
miRNA dizisinde mutasyon	Hatalı işlenme	↓	
	Hedefe bağlanmada farklılık	↑↓	↑↓
mRNA dizisinde mutasyon	Normalden farklı miRNA bağlanma paterni	↑↓	↑↓
Epigenetik değişiklikler			
Promotor metilasyonu veya kapalı kromatin	İfade azalması	↓	↑

Şekil 2.6. miRNA'lardaki bozuklukların miRNA ve mRNA işlevine etkisi.

2.4. Kanser ve miRNA

Hücre döngüsü kontrol mekanizmaları çalışmadığında ve hücre, apoptoz fonksiyonlarını yitirdiğinde kanserleşme sürecine geçer. Son yıllarda tümör oluşumunda miRNA'ların fonksiyonlarının etkili olduğu anlaşılmasıyla kanserin genetik nedenlerinin çok daha karmaşık olduğu belirlenmiştir (Karagün ve ark., 2014). Kanserle ilişkilendirilmiş genomik bölgelerin % 50'den fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patogenezinde etkili olduğunu ortaya koymuştur (Karagün ve ark., 2014).

Pek çok çalışma miRNA'ların hücre poliferasyonu ve ölüm mekanizmaları gibi birden çok biyolojik olayda anahtar moleküller olduklarını göstermiştir. miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte, farklı kanser türlerinde spesifik hücre tiplerinde miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin tespit etmek için kullanılan teknikler ayrıca çalışmalarda miRNA'ların kanserdeki potansiyel fonksiyonlarını belirleyebilmek içinde kullanılmaktadır. İlave olarak miRNA'ların birçok hastalığın oluşumunda rol oynadıkları belirlenmiştir (Akman ve ark., 2014).

miRNA'ların kanserleşme sürecine olan katkısı ile ilgili yapılan ilk çalışma Calin ve ark. (2001) yılında KLL'li hastalar üzerine yapılan moleküler çalışma ile tespit edilmiştir. Birden çok hasta üzerinde yapılan çalışmada miR-15a ve miR-16-1 düzeylerinin azalma gösterip yada göstermediği belirlenmiştir (Calin, 2002). KLL olan hastaların yaklaşık % 50'sinde 13q14 bölgesinde delesyon gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Michael ve ark. (2003) yaptıkları ilk çalışmada insanlardaki katı tümörler (rektal ve kolonik adenom karsinomlar) normal dokular ile kıyaslandığında ekspresyon düzeylerinin değişmiş olduğu miRNA'lar tespit edildi (Michael ve ark., 2003).

miRNA'lar, hedef aldıkları genlerin mRNA'nın moleküler yollardaki özelliklerine göre onkogenik yada tümör süpresör olarak fonksiyon kazanırlar (Rothschild, 2014). Bazı miRNA'ların normal dokularda protoonkogenlerin translasyonunu baskıladıkları tespit edilmiştir. İşlevi bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan bu miRNA'lara tümör süpresör miRNA'lar (TS-mir) denir. Dolayısı ile tümör suppressor miRNA'ların ekspresyonlarının azalması onkogenik miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin artmasına ve tümör oluşumuna neden olur. Bunun tam tersi olarak, onko-mir'lerin ise kanser gelişimini arttırdığı belirlenmiştir. Onkogenik miRNA'lar ise tümör süpresör miRNA'ların baskılanmasına neden olurlar. miRNA'lar, tümör süpresör veya onkogenlerin mRNA'ların ikisini de hedef olarak seçebilirler. Bundan dolayı, belirli bir miRNA'nın asıl işlevi tümör süpresör veya onkogenik hücrel miRNA'ların hücrel özelliğine bağlıdır (Cowland ve ark., 2007).

2.4.1. Tümör suppressor miRNA'lar

Fonksiyonları bir onkogenin ekspresyonunu kontrol etmek olan miRNA'lara Tümör-süpresör miRNA'lar (TSMiRNA) denir (Rothschild, 2014).

mikroRNA'ların kanserleşme sürecinde etkili olduklarına dair ilk veri 2001 yılında miR16-1'in ve miR-15a'nın keşfedilmesiyle raporlandı. Ancak bu miRNA'ların kanserleşme sürecinde nasıl etki gösterdikleri 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının KLL hastalıklı kişilerde yaptıkları çalışma ile tespit edildi. MiR16-1 ve miR-15a'nın sentezlenme düzeylerinin KLL'li hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters yönde ilişki gösterdikleri belirlendi. Böylece Cimmino ve arkadaşları yaptıkları çalışmada miR-15a ve miR16-1'in tümör süpresör fonksiyona sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Calin, 2002). Bu iki miRNA'nın düşük ekspre olmaları tümör süpresör fonksiyon kaybı ile yüksek seviyede Bcl-2 proteiniyle bağlantılı olduğu ve bundan dolayı hücrelerin anormal büyümesini gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu miRNA'ların yüksek seviyelerinin ise apoptoz ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda miR-15a ve miR16-1'in ekspresyon düzeylerinin KLL hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters fonksiyon gösterdiği tespit edildi. Akciğer kanseri hastaların normal dokusu ile normal akciğer dokusu karşılaştırıldığında genellikle let-7 seviyelerinin düşük olduğu belirlenmiştir (Madhu ve ark., 2008). Ayrıca tümör süpresör mikroRNA'lara örnek olarak miR-15a, miR16-1, miR-143, miR-27b, miR-125a, miR-29, let-7 ailesi gösterilebilir (Saydam ve ark., 2010).

Johnson ve ark. (2005) yılında yaptıkları çalışmada let-7'nin insanlarda bulunan etkili bir onkogen olan RAS'ın aktivitesini kontrol ettiği rapor edilmiştir (Johnson ve ark., 2008). Yapılan bu çalışmada, düşük düzeyde let-7 sentezleyen akciğer tümör dokularında yüksek düzeyde artmış RAS protein seviyeleri belirlenmiş. RAS onkogeninin mRNA dizisi, let-7'nin bu mRNA'ya bağlanmasına ve dolayısı ile hedef proteinin translasyonun baskılanmasını sağlayan let-7'ye komplementer bağlanma bölgeleri bulundurmaktaydı. let-7'nin düşük ekspresyonları, RAS geninin kontrolsüz bir biçimde işlev göstermesine olanak tanımıştır (Johnson ve

ark., 2008). Sonuç olarak yapılan çalışmalarda let-7 ailesine ait üyelerin, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyerek TS-mir olarak işlev gösterdikleri belirlenmiştir.

Tümör süpresör özellik gösteren miRNA'lar arasında Mir-29 ailesi üyeleride vardır. Üç farklı izoformu bulunan miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c) tümör süpresör fonksiyon sergileyen miRNA'lar içerisinde yer almaktadır. Mir-29 ailesinin üyelerinin KLL, invaziv meme kanseri, akut miyeloid lösemi, akciğer kanseri ve kolanjiyokarsinom hücrelerini baskılayarak fonksiyon gösterdikleri yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Iorio ve ark., 2005).

Birçok histolojik tümör çeşitlerinde miRNA-143'ün, kontrolsüz büyümeyi baskılama fonksiyonunun olduğu sergilenmiştir. B-hücreli kanserler, kolorektal, mesane, hipofiz ve serviks tümörlerinde, miR-143'ün tümör süpresör gibi işlev gördükleri tespit edilmiştir.

2.4.2. Onkogenik miRNA'lar

Tümör süpresör miRNA'lardan farklı şekilde işlev gösteren, onkogenik miRNA'lar genellikle kanserde kontrolsüz şekilde büyümeyi artırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler.

miRNA-155, ilk keşfi gerçekleşen ve protein ihtiva edemeyen gen olan BIC ile birlikte eksprese olan onkogenik miRNA'lardan bir tanesidir. miRNA-155'in hedef aldığı mRNA'lar tam olarak belirlenememiş ve ekspresyon düzeyinin tavukta lösemi ve lenfoma oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (Eis ve ark., 2005).

miRNA-21 ise onkogen ailesine ait bir mikroRNA olarak fonksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. miRNA-21'in KLL, AML ve glioblastoma gibi hematolojik tümörlerde mide, prostat, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanseri gibi birçok kanserde yüksek düzeyde ekspre edildiği görülmüştür.

miRNA-17-92 gen kümesi, insan genomu üzerinde kromozomun 13q31.3 bölgesine yerleşiktir. Bu gen ailesi altı farklı miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a,

miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlamaktadır. C-Myc onkogeninin fazla sentezinin gerçekleştiği transgenik farelerde miR17-19 gen kümesinin yüksek seviyede ekspresyona neden olan B hücreli lenfomanın gelişimini artırdığı belirlenmiştir. miRNA-17-92 gen kümesi üyelerinin çok çeşitli katı tümörlerde, meme, hematolojik malignansilerde, akciğer, pankreas, prostat, mide, kolon ve lenfomaları da içine alan kanser çeşitlerinde yüksek seviyede ekspresyonlarının gerçekleştikleri belirlenmiştir. miRNA-17-92 gen kümesinin kanser gelişimine katkısı iki farklı mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmüştür. Bunlardan birinci mekanizma birkaç lenfoma ve kanser türünde görülen 13q31 lokusunun amplifikasyonu, diğer mekanizma ise miRNA-17-92 gen kümesinden kodlanan pri-miRNA'nın transkripsiyonel aktivasyon şeklindedir. Bu da bir tumor suppressor miRNA'nın başka dokuda onkogenik miRNA olabileceğidir. Bazı miRNA'lar buldukları koşullara bağlı olarak hem tümör süpresör hem de onkogenik fonksiyon sergileyebilir. Bu gruba önemli bir örnek olarak kronik lenfosittik lösemi ve akciğer kanserinde bir tümör süpresör, meme kanserinde ise bir onkogen olarak işlev gösteren miRNA-29a'dır.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miRNA-155'in B hücreli lenfoma, akciğer, meme, pankreas ve Hodgkin lenfoma gibi kanser türlerinde yüksek seviyede ekspresyon sergilediği belirlenmiştir. Onkogenik miRNA'lara örnek olarak miR17-92, miR-372, miR-373, miR-2 gösterilebilir (Saydam ve ark., 2010).

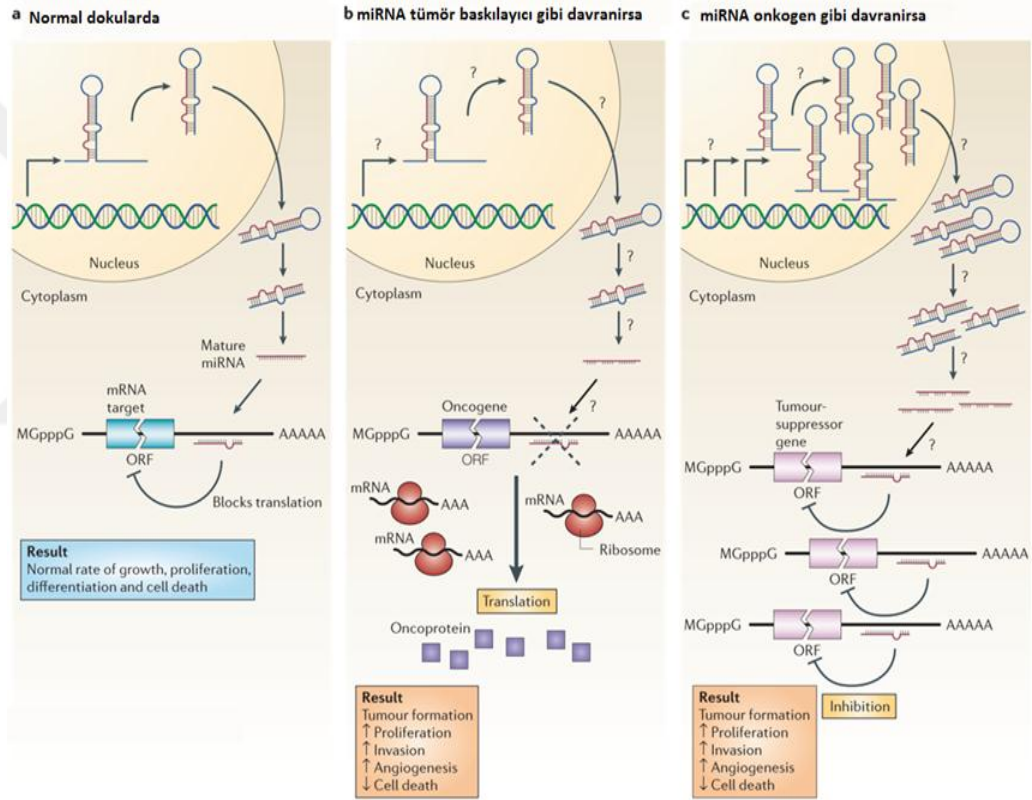
2.4.3. miRNA'ların tümör süpresör ve onkogenik olarak işlevi

MikroRNA'lar, normal dokularda transkribe edilip olgun mikroRNA'ya dönüştükten sonra gidip hedef mRNA'ya bağlanıp translasyonu bloke eder. Translasyonun baskılanması sonucu hücrede normal oranda; çoğalma, farklılaşma ve hücre ölümü gerçekleşir (Rothschild, 2014).

miRNA bir tümör süpresör miRNA gibi davranırsa ve hedef aldığı gen onkogen ise miRNA gidip hedef genin mRNA'sına bağlanamayıp translasyonel baskılama gerçekleşemiyor. Onkogenik protein sentezleniyor ve sonuçta tümör formasyonu oluşuyor. Tümör formasyonu oluşumu ile birlikte hücre çoğalması,

farklılaşma, anjiyogenez ve invazyon artıyor hücre ölüm oranı azalıyor (Rothschild, 2014).

miRNA'lar onkogen gibi davranırsa ve hedef aldığı gen bir tümör süpressör gen ise gidip hedef genin mRNA'sına bağlanıp translasyonel baskılamaya gerçekleşiyor ve sonuçta yine tümör formasyonu oluşuyor. Tümör formasyonu oluşumu sırasında hücre çoğalması, farklılaşma, anjiyogenez ve invazyon artıyor hücre ölüm oranı azalıyor (Şekil 2.7) (Rothschild, 2014).



Şekil 2.7. miRNA'ların işlevi

2.5. Microarray Yöntemi

DNA, RNA, protein fonksiyon ve bileşenlerinin gözlemlenmesinde, keşfedilmemiş gen tiplerinin bulunmasında ayrıca transkripsiyon varyantları ile canlı türlerinin farklı biçimlerinin saptanmasında aktif şekilde kullanılmakta olan biyoinformatiksel yaklaşımlardan biridir. Genel olarak mikroarray cam levha, naylon ve silikon benzeri sert yüzeylerin üstünde bulunan minyatürize bölgelere yerleştirilmiş birbiriyle özdeş, tek iplikçikli DNA parçacıklarının antikor ve antijenik determinatlar yardımıyla genom içerisinde depolanmış verilerin hibridizasyon gibi kendine özgü kimyasal bağlanma temeline dayalı bir prensip ile gözlemlenmesi yöntemidir. Sadece bir DNA/RNA mikroarray analizinde cam membrana tutturulmuş DNA parçacıklarının (Nükleotid uzunluğu 20 ile 100 veya daha da çok olabilmektedir) binden fazlası kullanılabilir (İpekdal, 2006). Nükleik asit bileşiklerinin düzenli şekilde dizilmesiyle bir array oluşmaktadır. Keşfedilmiş ve keşfedilmeyi bekleyen DNA ve RNA bileşiklerinin baz eşleşmesi özelliği dikkate alınarak hibridizasyona makul bir alan sağlanarak, keşfedilmeyi bekleyen RNA ve DNA'ların keşfedilip tanımlanmasında kullanılmaktadır. Özetle mikroarray tekniğinin en mühim özelliği, dar bir alanda birden çok genomik gözlemin yapılmasına imkan vermesidir. Küçük bir alana bir mikroorganizmaya ait bütün genler yerleştirilebilir. Ayrıca binden fazla genin ekspresyonları aynı anda yalnız bir deneyde çalışılabilir. Mikroarray yönteminin en heyecan veren tarafı, ilerleyen dönemlerde ufak bir cihaz yoluyla, küçük miktarlarda örnekler kullanmak suretiyle, yalnız bir deneyle mikroarrayler, SNP'lerin normal veya hastalık taşıyan gen ekspresyonlarının (mRNA' da artış veya azalışlar) seri bir şekilde çalışılmasına olanak sağlayacak ve böylelikle hasta başında çok sayıda hastalık ve hastalığa neden olan etken arasında ayırıcı bir tanı yapılmasına ve tedavi sonucunun değerlendirilmesinde önemli bir rol oynayacaktır (Choi, 2004).

2.5.1. Microarray teknolojisinin gelişimi

Mikroarray gelişimi 1869 yılında Miescher'in DNA izolasyonunu gerçekleştirmesi, 1975'de ise Southern blotting hibridizasyon ile 1985'de PCR teknolojisinin keşfedilmesiyle beraber moleküler ve mikrobiyolojik çalışmalar kayda değer gelişim göstermekteydi. Önceden yapılan bütün yayın kaynakları yalnız bir genin veya operonun sekans analizi üzerinde yoğunlaşmışken bundan böyle sadece bir yayının ve bütün bir genoma ait sekans analizinin yapıldığı zamana gelinmiştir (Cucchini ve ark., 2001). Mikroarray yönteminin başlangıç girişimleri Schena ile Shalon tarafınca gerçekleştirilmiştir (Savlı, 2003). Çiplerin bulunduğu yüzeyleri hazırlamak için ilk ekip Brown ve arkadaşlarınca oluşturulmuş sonrasında ise çalışmalara yeni ekipler de eklenmiştir.

Mikroarray teknolojisi'nin gen ekspresyonunun kullanımıyla alakalı çalışmalar ilk defa 1995'te Science Dergisi'nde yayınlanmıştır (Schena ve ark., 1995). Bu yöntemle bulunan ilk ökaryotik genom ise *Saccharomyces cerevisiae*'ninki olmuştur. Ayrıca bu konuyla ilişkili çalışma ise yine Science Dergisi'nde, 1997 senesinde yayınlanmıştır (İpekdal, 2006). Genleri tanımlayabilmek için UniGene ve GenBank benzeri birden fazla bilgi kaynağı kullanılır (Savlı, 2003).

2.5.2. Mikroarrayin kullanım ve uygulama alanları

İlk array yöntemi 1980'li yılların ortasında keşfedilmiş ve mikroarray şeklinde adlandırılmıştır. Cihaz üretiminde ilk olarak 300 mikronmetrelik DNA problemleriyle başlanmış ve spot büyüklükleri 300 mikronmetre olarak ayarlanmıştır. Genel olarak DNA klonlama, PCR ürünleri veya oligonukleotidlerde ayrıca radyoaktif nitelikte etiketlenmiş olan hedeflerde de kullanılmıştır. Bu teknoloji ile oluşturulan cihaz ilk kez tıp alanlarında kullanıldı. Daha sonra geliştirilen mikroarray cihazları ise iğne uçlu yüzeyler (pin spotter) kullanılarak tasarlanmıştır. Bu iğne temelli robotik sistemde bir cam yüzeye yaklaşık 150 mikronluk DNA solusyonları homojen bir şekilde dağıtılmıştır. 1990'lı yıllarda ise, araştırmacılar mikroarray yöntemini farklı

profiller gösteren doku çeşitleri ve farklı süreçlerde bulunan bakteriyel hücreleri değerlendirmek ve tespit etmek için kullanılmışlardır.

İnsan genom projesiyle birlikte ortaya çıkarılan gen dizilerinden sonra, yeni oluşturulan amaç: bu genlerin nasıl ifade gösterdiklerini bulmak (yani mRNA profillerini çıkarmak), diğer genlerle beraber nasıl bir ilişki kurduklarını göstermek ve böylece belirli hastalıklarda hangi genlerin rol oynadığını ortaya çıkarmak olmuştur. Bir hücrenin karakteri veya içinde bulunduğu evre o hücrenin mRNA ifadesi ile ilgilidir. Daha önceden ifadesi tanımlanmamış genlerin ifade seviyeleri incelenerek ve diğer bilinen genlerin mRNA ifadeleri ile karşılaştırılarak o genlerin fonksiyonları hakkında bilgiler edinilmeye çalışılmıştır. Fakat tüm genleri eş zamanlı olarak inceleyebilmek; oldukça zor, uzun zaman ve emek isteyen, özen gerektiren bir süreçtir. Geleneksel moleküler biyoloji yöntemleri ile (örneğin Northern Blotting) bir deneyde sadece tek bir gen incelenebilmekte, bu ise ilgili genin işlevi ve diğer genlerle/hastalıklarla ilişkisinin belirlenip açığa çıkarılması konusunda yeterli bilgiyi sağlayamamaktadır. Yakın zamanda geliştirilen ve ülkemizde sayılı laboratuvarlarda bulunan Mikrodizin cihazı ile; yaklaşık 1.8x1.8 cm ebatlarındaki bir cam üzerinde neredeyse tüm bir genomu bir seferde yüksek hassasiyette inceleme olanağı mevcuttur. Bu da bize aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisi hakkında görsel ve matematiksel sonuçlar elde etmenin mümkün olduğunu göstermiştir (Anonim, 2007).

Mikroarray teknolojisinin uygulama alanları gün geçtikçe daha da artmaktadır. Birden fazla DNA moleküllerinin lam veya naylon membranlar üzerine nokta şeklinde yerleştirilmesi ile mikroarray çipler oluşturulur. Kullanım alanları, gen ifade profillerinin belirlenmesi, gen mutasyonlarının belirlenmesi ve analizinde, genotiplemede, gen ve klonlarının haritalanması, kromozomal aberasyon belirlenmesi mikrodelyasyon tespiti olarak sıralanabilir (Karaca ve ark., 2004). Ayrıca kullanım ve uygulama alanları:

- Hastalıklara yatkınlığın çok daha önce belirlenmesinde,
- Kişiye özel ilaç ve tedavi belirlemede,

- Gen'e uygun tedavi ve özgül ilaç tasarlanmasında,
- Adli tıp çalışmalarında,
- Genetik olarak yapılan testler,
- Tarım alanlarında daha sağlıklı ve verimi yüksek olan çiftlik hayvanlarının geliştirilmesinde,
- Besin kalitesi yüksek olan yüksek olan ürünlerin geliştirilmesinde,
- Islah çalışmalarının daha kısa sürede yapılması yani zaman kazanılmasında, vb. birçok uygulamada kullanımı mevcuttur.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta seçimi

Çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesine başvuran, patolojik olarak kolon kanseri teşhisi konmuş hastalardan alınan örnekler kullanıldı. Çalışma için etik kurul onayı alındı (Harran Üniversite, Tıp Fakültesi Etik Kurulu Rapor No: 2014/020). Hastaların; yaşı, cinsiyeti, iletişim bilgileri alındı. Çalışmada 4 erkek ve 2 kadın hastanın kolon doku materyali kullanıldı. Çalışma için kolon kanserli hastaların hem kontrol dokusu hem de tümör dokusu 200 ml RNA later solüsyonu içerisine konularak laboratuvarımıza getirildi ve toplamda 12 örnek olacak şekilde çalışıldı. Dokular -80 °C de muhafaza edildi. Çalışmada RNA later solüsyonu ile fikse edilmiş kolon kanserine sahip hastaların normal ve tümörlü kısımlarından alınan doku örnekleri (0.5 cm³) kullanıldı. Her bir hastanın normal ve tümör dokularında bulunan onkogenik miRNAları belirlemek üzere mikroarray yöntemi ile çalışıldı ve bu çalışma için GeneChip miRNA 2.0 Array (Affymetrix) protokolü kullanıldı.

3.2.Yöntem

3.2.1. Mikroarray yöntemi

1. Total RNA Hazırlanması,
2. Poly (A) Kuyruğu Eklenmesi,
3. Ligasyon Aşaması,
4. Hibridizasyon,
5. Yıkam-Boyama-Tarama,
6. Analiz olmak üzere altı basamaktan oluşmaktadır (Şekil 3.1).

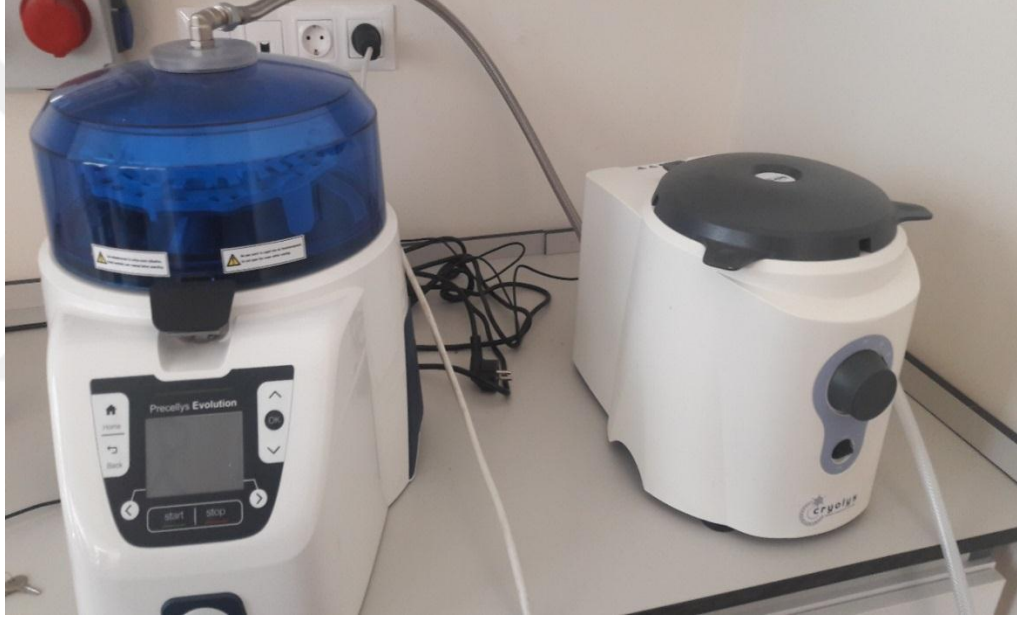


Şekil 3.1. Mikroarray cihazı

3.2.1.1. Total RNA izolasyonu

Çalışmada, -80°C de mufaza edilen normal ve tümörlü kolon dokularından Qiagen miRNeasy Mini Kit kullanılarak total RNA'ları izolasyonu gerçekleştirildi. Normal ve tümörlü kolon dokularından yeterli miktarda doku parçası (0.5 cm^3) alınıp 2 ml'lik tüplere aktarıldı. İçerisinde toplamda 10 manyetik top bulunan tüplere alınan doku parçalarının 1.5 katı kadar Qiazol ilave edildikten sonra tüpler homojenizasyon cihazına yerleştirildi. Homojenizasyon cihazı 7600 RPM de 3 döngüde ve her bir döngü 30 sn olacak şekilde programlandı. İşlem sonucunda elde edilen doku sıvısı tüplerden alınarak 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Tüplere 140 μl kloroform ilave edilerek 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12 000g /15 dk/ $+4^{\circ}\text{C}$ de santrifüj edildi. Üst faz yeni tüplere alınarak tüplerdeki örneklerin üzerine 1.5 katı kadar % 100 etanol eklendi. Her seferinde 700 μl örnek her seferinde 2 ml'lik miRNeasy spin kolonlara eklendikten sonra 8000 g/15 sn santrifüj yapıldı ve kolonların altında bulunan toplama tüplerindeki sıvı atıldı. Bu işlem örnek bitinceye kadar devam ettirildi. İşlem sonunda spin kolonlar yeni eppendorf tüplere

alındı. 700 µl RWT spin kolonlara eklendi ve 8000g de 15 sn santrifüj edildi. Daha sonra spin kolonlar yeni eppendorf tüpe alınarak üzerine 500 µl RPE eklendi. 8000 g de 15 sn santrifüj edildikten sonra 500 µl RPE tekrar eklenerek 8000g de 2 dk santrifüj edildi. Yeni tüplere transfer edilen spin kolonlar 13 000g de 1 dk santrifüj edildikten sonra Spin kolonlar yeni eppendorf tüplere alındıktan sonra 30 µl RNease free water eklendi. 8000g de 1 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki iki defa tekrarlandı. Santrifüj sonunda eppendorf tüplerdeki total RNA -80 °C de muhafaza edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Doku homojenizatör cihazı

3.2.1.2. RNA kalitesinin ve miktarının belirlenmesi

3.2.1.2.1. Nanodrop ölçümü

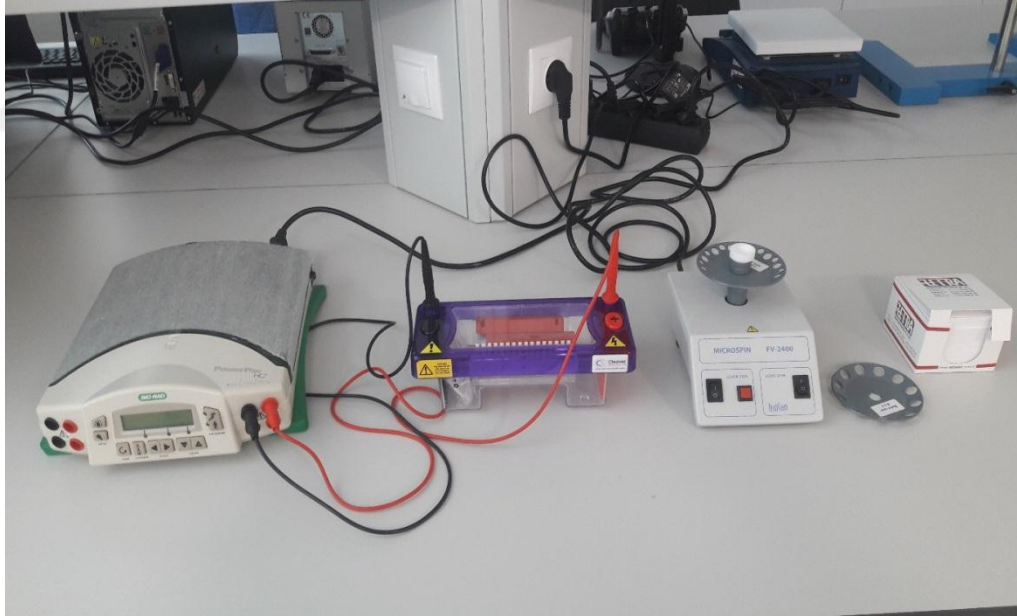
Total RNA içeren örneklerinin Nanodropta ölçümü için -80 °C den alınarak oda koşullarına getirildi. Örnekler 5 sn vortexlendi. Nanodrop cihazında ilk olarak referansımız RNease free water dan 2 ml alınarak okutuldu. Daha sonra her bir örnekten 2 ml alınarak total RNA miktarı ölçüldü. Her bir RNA örneği için, OD260

(nükleik asit optik dansite) ve OD280 (protein optik dansite) değerleri UV-VIS spektrofotometrede (Implen) belirlendi. Mikroarray aşamasında saf RNA eldesi için 260/280 oranının 1.7 ile 2 değerleri arasında olması gerekmektedir.

3.2.1.3. Elektroforez

3.2.1.3.1. Elektroforez ve jel hazırlanması

5 gr agar hassas terazide ölçülerek 50 ml'lik cam şişeye konulduktan sonra üzerine 100 ml (1X) TAE eklendi. 1.3 ml Sodyum hipoklorit (NaClO) eklenerek hafifçe karıştırıldıktan sonra mikrodalga fırında agar çözününceye kadar ısıtıldı. Şişe oda sıcaklığında soğutulmaya bırakıldı, oda sıcaklığına gelince 4 damla jelred boyası eklenerek hafifçe karıştırıldı. Hazırlanan jel karışımı elektroforez tankına dökülerek soğutulmaya bırakıldı (Şekil 3.3).

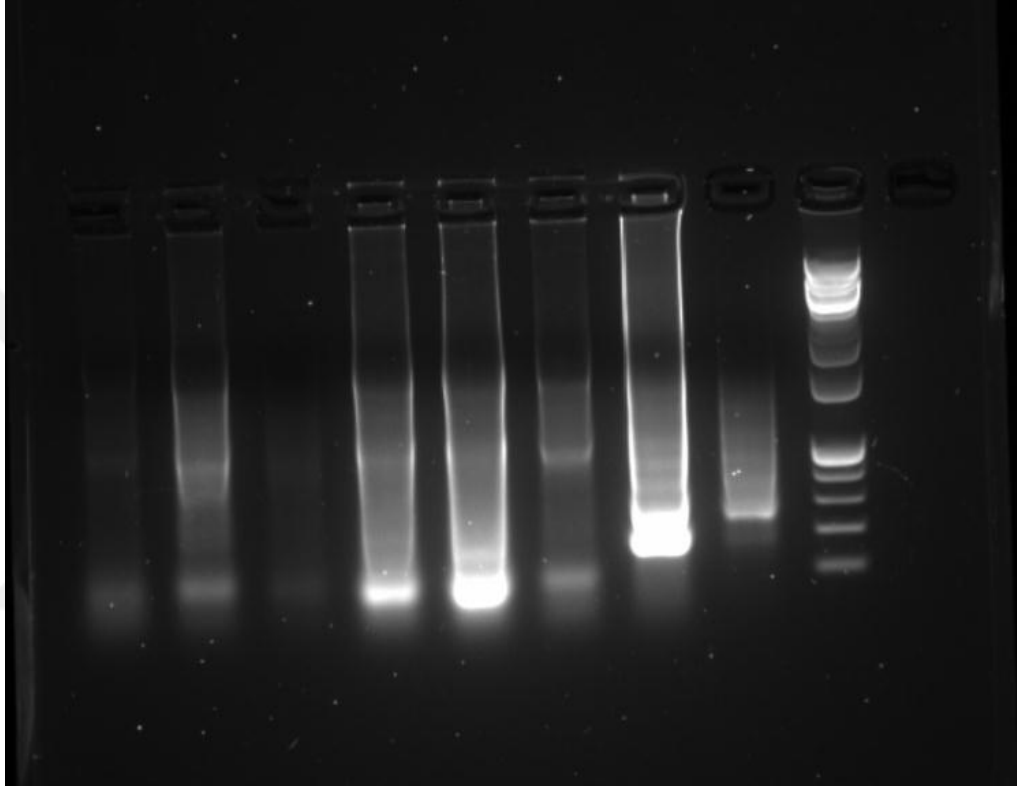


Şekil 3.3. Elektroforez cihazı

3.2.1.3.2. RNA örneklerinin agaroz jele yüklenmesi

5 µl RNA örneği ile 2 µl 10X yükleme boyası karıştırıldıktan sonra 1X TAE tampon çözeltisinden agaroz jel yüzeyini kaplayacak şekilde tanka eklendi. Jeldeki

ilk kuyucuğa 4 ml DNA markır yüklendi. Diğer kuyucuklara ise örnek sırası not edilerek hazırlanan RNA +boya karışımı eklendi. Agaroz jel elektroforez sistemi (Clever) güç kaynağına bağlanıp, 115 volt, 110 mA, 90 dakikada örnekler yürütüldü. Bu süre sonunda agaroz jel görüntüleme cihazına (Chemidoc Biorad) yerleştirilip UV ışığında görüntüler alındı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Agoroz jel görüntüsü

3.2.1.4. Poly (A) Kuyruğunun Eklenmesi

Bu aşama RNA molekülüne 3' ucundan poly (A) kuyruğu ekleme aşamasıdır. Poly (A) kuyruğu eklenmesi için +4 °C muhafaza edilen Affymetrix Flash Tag/Biotin HSR RNA Labelling kiti kullanıldı. Kuyruklama için ATP karışımının 1 Mm' lik TRIS ile diüle edilmiş olması gerekmektedir. Poly (A) Tailing Master mixde kullanılmak üzere ATP miks (1: 500 = 1 µl stok ATP (Vial 3) + 499 µl 1 Mm Tris) hazırlandı. Tüm örnekler için eşit miktarda RNA ile çalışılmaya başlandı. Array çalışması için -80 °C bekletilen örnekler çözündükten sonra spin yapıldı. Tekrar nano spektrofotometre ile okunduktan sonra örnekler blok içerisine sırasıyla yerleştirildi.

Örnekler 1000 ng ve totalde 8 µl olacak şekilde, hazırlandıktan sonra örnekler eppendorf tüplere sırasıyla 2 µl (Vial 8) eklendi. Hafif karıştırılıp spin yapıldı. Çalışmamızda 2 örnek için X 2.5 olacak şekilde Poly (A) Tailing master mix hazırlandı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Poly (A) Tailing master mix

Bileşenler	Örnek	X 2.5	X 3	X 7
10X Reaction Buffer (Vial 1)	1.5 µl	3.75 µl	4.5 µl	10.5 µl
25Mm MnCl ₂ (Vial 3)	1.5 µl	3.75 µl	4.5 µl	10.5 µl
SulandırılmışATP Mix(1/500)(Vial 3)	1 µl	2.5 µl	3 µl	7 µl
PAP Enzim (Vial 4)	1 µl	2.5 µl	3 µl	7 µl
TOTAL	5 µl	12.5 µl	15 µl	35 µl

*Bu arada PCR cihazına 37 °C ve 15 dakika olacak şekilde giriş yapıldı.

5 µl Poly (A) Tailing master mix'ten 10 µl, RNA spike control oligos'dan alınarak tüplere eklendi. Toplam 15 µl'lik karışım hafif spin yapıldı. Hazırlanan karışım 37 °C de 15 dakika olacak şekilde inkübatüre bırakıldı.

3.2.1.5. Flash Tag Biotin HSR Ligasyon

İnkübasyon sonrasında 15 µl olan karışım soğuk blok üzerinde bekletildi. 15 µl karışım üzerine 4 µl 5x Flash Tag Biotin HSR Ligation mix (Vial 5) eklendi. Ligation mix eklendikten sonra 2 µl T4 DNA ligas (Vial 6) her örneğe eklenek karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında (25 °C'de) 30 dk inkübe edilmeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler üzerine 2,5 µl HSR Stop solution (Vial 7) ilave edildi. Böylece toplamda 23,5 µl karışım elde edildi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Ligasyon aşamasında kullanılan mix içeriği

Component	Volume
5X Flash Tag Biotin HSR Ligation Mix Biotin (Vial 5)	4.0 µl
T4 DNA Ligas (Vial 6)	2.0 µl
30 dakika inkübasyon	
Stop Solution	2.5 µl
TOTAL	23.5 µl

Toplam karışım 6 saat buz üzerinde bekletildikten sonra -20 °C'de 2 hafta süreyle hibridizasyon işlemi için muhafaza edildi.

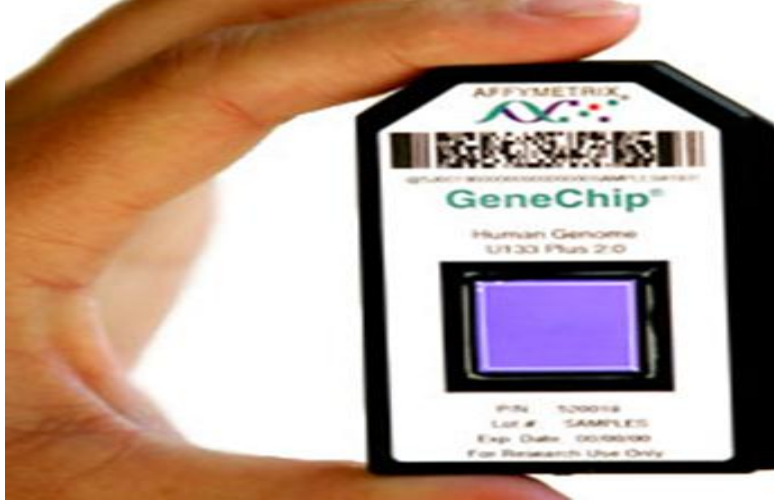
3.2.1.6. Hibridizasyon

Bu aşama miRNA 2.0 çiplere göre hazırlandı. Hibridizasyon işlemi için -20 °C de bekletilen örnekler alınıp çalışma için oda sıcaklığında bekletildi. Sonraki aşamada hibridizasyon kokteyl hazırlandı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Hibridizasyon kokteyl

COMPONENT	1X	6.5X
2X HYBRIDIZATION	50 µl	325 µl
27.5%FORMAMİDE(vial 12)	15 µl	97.5 µl
DMSO	10 µl	65 µl
20Xhybrization	5 µl	32.5 µl
Kontrol Oligo B2,3nM	1.7 µl	11.5 µl
Total Volume	81.7 µl	

Hazırlanan kokteyl 65 °C 5 dk inkübe edildi. 23.5 µl olan her bir örnek üzerine 81.7 ml hibridizasyon miks ilave edildikten sonra toplam hacim volume 105.2 ml oldu. Örneğimiz 99 °C 5 dk ve 45 °C 5 dk inkübe edildi. Bu sırada çipler yükleme işlemi için +4 ten alınıp oda sıcaklığına getirildi. Inkübasyon sonunda çiplere yükleme yapıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikroarray çip

Çipin arka yüzeyinde çapraz yerleşmiş şekilde bulunan iki septadan birine pipet ucu takıldı diğer septa ise örnek yüklemesi için açık bırakıldı. Çiplere örneğimizden 100 µl yükleme yapıldıktan sonra her iki septa yapışkan kağıt ile kapatıldı. Daha sonra yükleme yapılan çipler hibridzasyon fırınına bırakılıp 48 °C de 60 RPM’de 16 saat inkübe edildi. İnkübasyondan alınan çiplerin arka septalarındaki yapışkan kağıtlar sökülerek Fluidisc cihazına yerleştirildi.

3.2.1.7. Yıkama-boyama-tarama

Çipler Gene Chip Fluidics Control sistem üzerine yerleştirildi. Cihazın kenarındaki şişelere 400 ml Wash A, Wash B ve nH₂O eklendi. Cihazın hortumları şişelere yerleştirildi. Cihaz üzerinde bulunan 4’lü bölmelerdeki tutucu yerlere üçer adet 1.5 ml lik eppendorf tüpler yerleştirildi. Yıkama işlemine başlamadan önce Fluidics System açılarak “prime” işlemi yapıldı. Prime sonrasında yıkama boyama işlemine geçildi. Boyama işleminde kullanılan solüsyonlar fluidisc cihazına yerleştirildi ve “prime” yapıldı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Boyamada kullanılan solüsyonlar

Tüp	Bileşenler	(1 Örnek) µl
1	Stain Buffer 1	500
2	Stain Buffer 2	500
3	Array Holding Buffer	800

Çipler cihazdan alındıktan sonra cihazın tekrar yıkaması yapıldı. Fludisc cihazından alınan çiplerin arka kısımda bulunan septalara tekrar tak spotla kapatıldı ve cihaz hazır konuma geldiğinde çipler önu arkaya bakacak şekilde cihaza yerleştirildi ve tarama işlemi başlatıldı. Daha önce sisteme tanıtılan örneklerin isimleri seçildiğinde otomatik olarak array ile uyumlu script aktiflendi.

3.2.1.8. Analiz

İstatistiksel analiz Affymetrix Gene Chip 2.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Affymetrix Gene Chip yazılımında arraylerin “Quality Control Metrics” değerleri incelenerek ve uygun olmayan örnekler analiz dışı bırakılarak örneklerin tümör ve normal doku gruplamaları yapılarak fold change değerleri karşılaştırılarak tümör ve normal doku arasında farklı eksprese olan miRNAlar belirlendi. Örnekler tek yönlü ANOVA testi ile farklı eksprese olan miRNAlar belirlendi. Örnekleri Tümör/normal şeklinde gruplamalarında farklı eksprese olan miRNAlara yönelik kümeleme analizi (Clustering) yapıldı. Hesaplama sonuçları p değerinin 0.05’ten küçük olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kolorektal kanser, dünyada en sık görülen kanser türlerinden biridir. Her iki cinste en yaygın görülen 3. kanser türü olup, tüm kansere bağlı ölümlerin içerisinde akciğer kanserinden sonra en fazla öldüren kanser türüdür. Klinik ve patolojik gelişmelere rağmen kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılan kriterler sınırlı kalmaktadır. Son yıllarda, moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ışığında hücre biyolojisinde etkili olduğu düşünülen yeni moleküller tanımlanmaya başlanmıştır. 2000'li yılların başından itibaren, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine dönüşümü gerçekleştirilmeyen miRNA molekülleri keşfedilmiştir. Yaklaşık 20-24 nükleotid büyüklüğündeki bu küçük RNA molekülleri miRNA olarak isimlendirilmektedir (Bedeir ve ark., 2005; Iorio ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar sonucu, bu moleküllerin hücre büyümesi ve hücre ölümü üzerinde etkili oldukları belirlenmiş ve bunun üzerine miRNA'ların kanserli dokularda araştırılması önem kazanmıştır. Araştırmacılar bu küçük mikroRNA moleküllerinin hücrede birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldıklarını ve bununla birlikte, hücrede miRNA ekspresyonunun normal dokuda eksprese edilen seviyelerin dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (Pillai ve ark., 2007). Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucu miRNA'lar kolon kanseri'nin erken teşhis, tanı ve tedavisinde güçlü bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

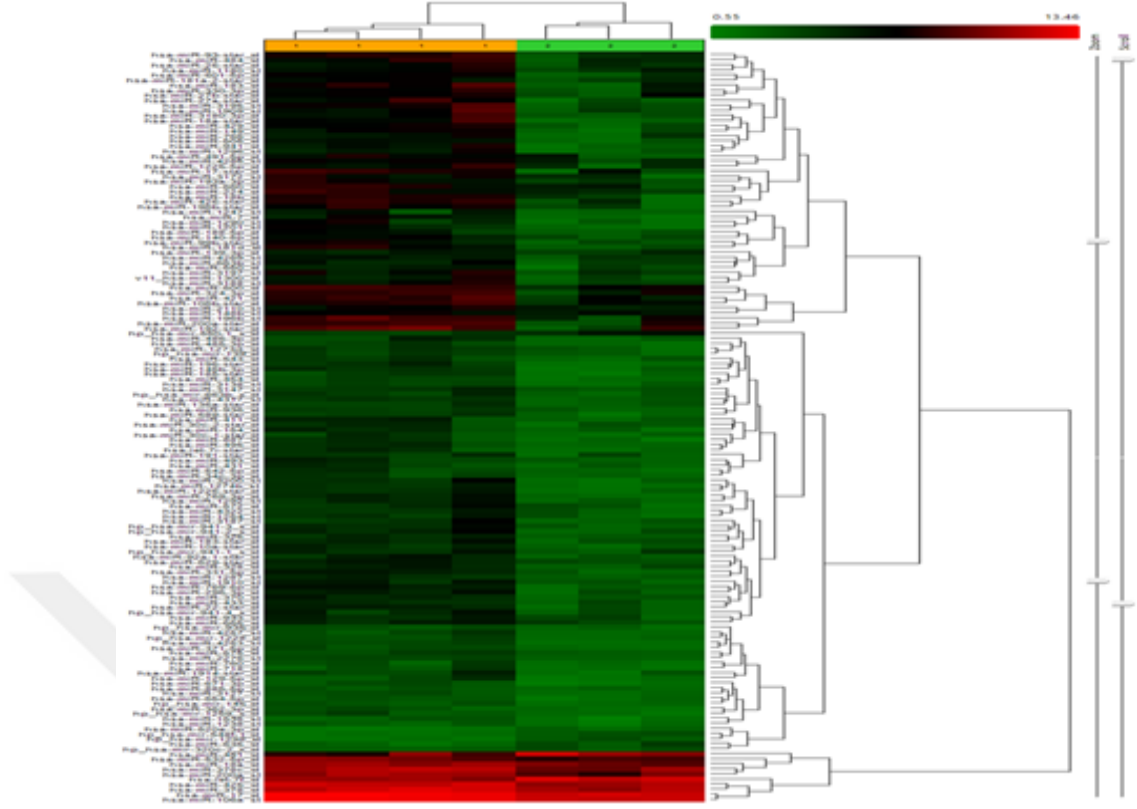
Çalışmamızda cerrahi parça alma işlemine girmiş ve kolorektal kanser teşhisi konmuş 6 hastanın, kolon bölgesinin sağlam ve tümörlü doku kısımlarından alınan örnekler mikroarray yöntemi kullanılarak miRNA analizleri yapılmış ve analiz sonucu onkogenik miRNA'lar belirlenmiştir. Hastaların sağlam ve tümörlü kısımlarından alınan örneklerin analizi sonucu 10 adet onkogenik miRNA tespit edildi. Belirlenen miRNA'ların artan ya da azalan şeklinde ekspresyonları analiz edildiğinde 10 adetinin tümörlü dokularda normal dokulara oranla yüksek ifade edildiğini ve kat değişim düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Onkogenik miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla mikroarray yöntemi kullanılmıştır. Mikroarrayle elde edilen Fold Change değerleri üzerinden kat değişimi hesaplanmış ve tümörlü dokudaki miRNA ile sağlam dokudaki miRNA'ların ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Tümörlü ve normal dokuda onkogenik olarak eksprese edilen miRNA seviyelerinin karşılaştırılması

Onkogenik MikroRNA'lar	Tumor Bi-weight Avg Signal (log2)	Kontrol Bi-weight Avg Signal (log2)	Fold Change (linear) (Tumor vs. Kontrol)	ANOVA p-value (Tumor vs. Kontrol)
hsa-mir-1290	5,94	1,33	24,55	0,014333
hsa-mir-27a	6,67	2,37	19,63	0,002068
hsa-mir-18b	7,66	3,74	15,2	0,003125
hsa-mir-196b	8,33	5,25	8,42	0,029486
hsa-mir-224	7,32	4,79	5,81	0,018635
hsa-mir-1292	5,12	1,82	9,85	0,002905
hsa-miR-3180-3p	6,42	2,8	12,32	0,00291
hsa-mir-191	4,4	2,12	4,83	0,029834
hsa-mir-543	4	1,87	4,36	0,021473
hsa-mir-183	5,06	3,12	3,86	0,00954

Mikroarray sistemleri kullanılarak, 6 kolon tümörden normal dokulardaki miRNA'lar ile tümörlü dokulardaki miRNA'ların ekspresyon profilleri analiz edilmiştir. Öncelikle tümör dokudaki miRNA ekspresyon seviyeleri normal dokudaki ekspresyon seviyeleri, web tabanlı Mikroarray-Data Analiz (Mikroarray data analysis version 2.0) programından yararlanılarak karşılaştırılmıştır.



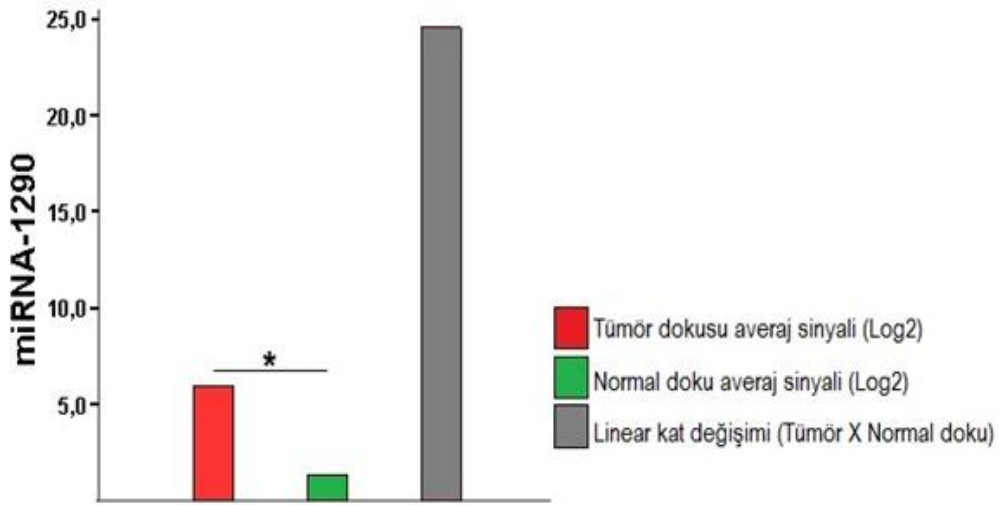
Şekil 4.1. Dendrogram

Her sıra bireysel miRNA'yı temsil etmektedir. Hiyerarşik kümelenmede, benzer ifade kalıplarına sahip olan genler bir araya toplanmakta ve bir dizi dal (kümelenme ağacı veya dendrogram) ile birbirine bağlanmaktadır. Dendrogramdaki kırmızı renkler, normalden daha yüksek ekspresyon seviyelerine işaret ederken, yeşil renkler normalden daha düşük ifade seviyelerini göstermektedir.

4.1. miRNA-1290'nın Ekspresyon Profili

miRNA-1290'nın, CRC'de İnositol fosfolipid fosfataz inositol polifosfat 4-Fosfataz B (INPP4B)'yi hedefleyerek kolorektal kanser hücre proliferasyonuna katkı sağlayan onkogenik bir biyobelirteçtir (Qingzhu ve ark., 2017). MiR-1290, Kolon Kanserinde KIF13B'yi hedefleyerek sitokinezi bozduğunu ve yeniden programlamayı etkilediğini göstermektedir (Wu ve ark., 2013).

Çalışmamızda miR-1290 mikroarray analiz sonucunda (Şekil4.2), tümörlü dokularda (5,94) normal dokuya (1.33) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (4.466 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (24.55, $p<0.003$).



Şekil 4.2. miRNA-1290'nın normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p<0.05$)

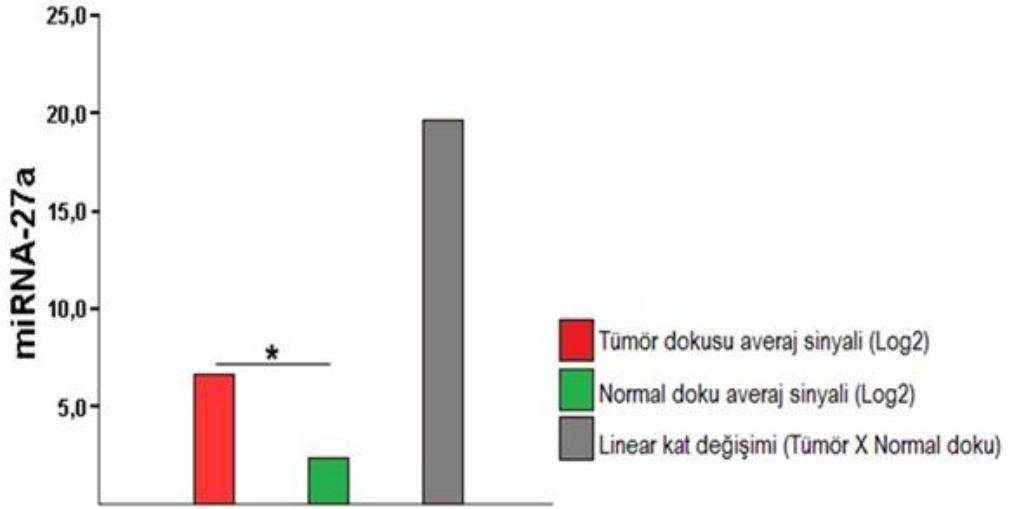
Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen Qingzhu ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmadakine benzer olarak INPP4B'nin miR-1290'nın hedef geni olduğu yüksek ekspere edilerek bu geni baskıladığı ve hücre proliferasyonuna katkı sağladığı belirtilmiştir. Wu ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada ise miR-1290'nın KIF13B'yi hedefleyerek sitokinezi bozduğunu

ve yeniden programlamayı etkilediği belirtilmektedir. Elde ettiğimiz verilerimiz diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. miR1290'nın tümörlü dokudaki ekspresyona bakıldığında onkogenik bir miRNA olabileceğini desteklemiştir.

4.2. miR-27a'nın Ekspresyon Profili

miR-27a'nın HLEC'lerde aşırı ekspresyonu, lenfatik tüp formasyonunu ve göçünü artırırken, miR-27a'nın inhibisyonu lenfatik tüp formasyonunu ve göçünü azalttı. MiR-27a'nın, TGF-y yolunun önemli bir bileşeni olan SMAD4'ü doğrudan hedeflediğini ve miR-27a'nın SMAD4'ü hedefleyerek lenfanjiyogenezi teşvik ettiğini gösterdi. Çalışma sonucu miR-27a'nın kolon kanserinde yeni antikanser tedavileri için potansiyel bir hedef olabileceğini göstermiştir (Xu ve ark., 2017). miRNA-27a'nın hedef geni SFRP1 olduğu bulunmuştur. miR-27a'nın yüksek ifadesi Wnt / β -Katenin Sinyal yolu ile SFRP1'i hedefleyerek bu genin düşük ifadesine neden olduğu ve bunun sonucunda kolon kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu artırdığı görülmüştür (Ba ve ark., 2017).

Çalışmamızda miR-27a'nın mikroarray analiz sonucunda (Şekil4.3), tümörlü dokularda (6.67) normal dokuya (2.37) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (2.814 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (19.63, $p < 0.003$).



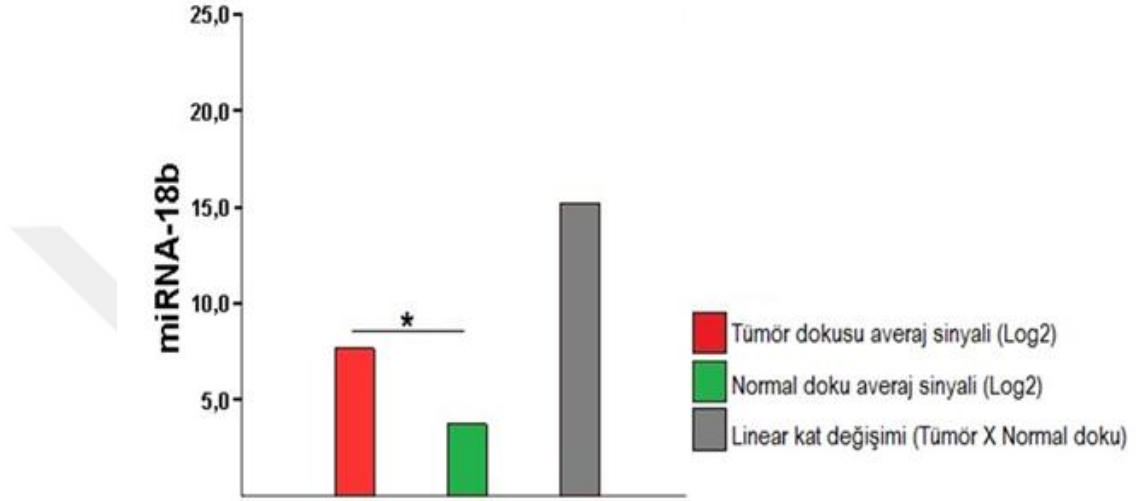
Şekil 4.3. miRNA-27a'nın normal ve tümürlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)

Çalışmamızda ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen Xu ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada miR-27a'nın SMAD4'ü doğrudan hedeflediğini ve miR-27a'nın SMAD4'ü hedefleyerek lenfanjiyogenezi teşvik ettiğini gösterdi. Ba ve ark. (2017) tarafından bildirilen çalışmada ise miR-27a'nın yüksek ifadesi SFRP1'i hedefleyerek bu genin düşük ifadesine neden olduğunu ve proliferasyonla invazyonun artışı belirlendi. Verilerimiz çalışmalarla paraleldir. miRNA-27a'nın tümürlü dokulardaki yüksek ekspresyonu hedef genlerin inhibisyonu ile sonuçlandığı ve tümör oluşumunu desteklediğinden dolayı onkogenik bir miRNA olabileceğini desteklemiştir.

4.3. miR-18b'nin Ekspresyon Profili

miR-18b'nin CDKN2B'yi hedefleyerek CRC karsinogenesinde rol oynadığını göstermektedir. miR-18b'nin upregülasyonu, CDKN2B'yi inhibe ederek Kolorektal Kanserin gelişimine katkıda bulunduğu ve miR-18b'nin aşırı ekspresyonu, hücre döngüsü ilerlemesini kolaylaştırarak hücre proliferasyonunu arttırmıştır (Li ve ark, 2017).

Çalışmamızda miR-18b'nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.4), tümörlü dokularda (7.66) normal dokuya (3.74) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (2.048 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (15.2, $p < 0.003$).



Şekil 4.4. miRNA-18b'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p < 0.05$)

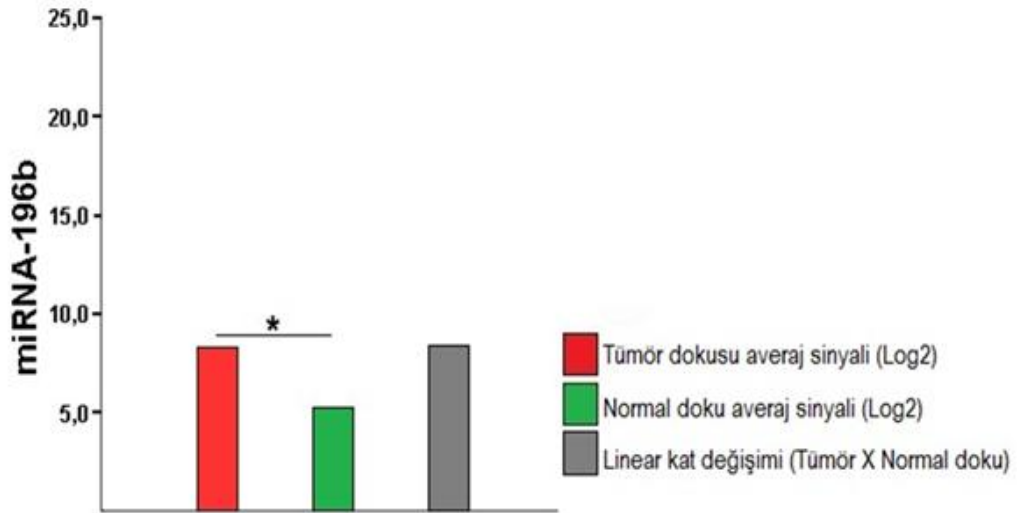
Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen Li ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile miR-18b'nin tümörlü dokulardaki ekspresyonu paralellik göstermektedir. miR18b'nin tümörlü dokudaki ekspresyona bakıldığında onkogenik bir mikroRNA olabileceğini desteklemiştir.

4.4. miR-196b'nin Ekspresyon Profili

miR-196b'nin hedef geni GATA6 olduğu belirlenmiştir. GATA6, GATA ailesinin transkripsiyon faktörlerinin bir üyesi olup, CRC hücrelerinde miR-196b'nin, GATA6'nın intestinal epitelyal hücrelerin homeostazı ve farklılaşmasında rol oynayan bir transkripsiyon faktörü ve Wnt/y-katenin yolağının pozitif bir düzenleyicisi olduğunu gösterdik. MiR-196b, GATA6 bağırsak transkripsiyon faktörünü inhibe eder ve kolon kanseri hastalarında yukarı regüle edilir (Fantini ve ark., 2017). MiR-196a ve miR-196b'nin CRC'li geniş bir hasta grubuna uygulanan

verilerimiz, komşu normal kolorektal mukozaya kıyasla CRC dokularında hem miR-196a hem de miR-196b'nin yukarı doğru düzenlendiğini doğrulamıştır. CRC'li hastalarda miR-196a ve miR-196b'nin upregülasyonu, tümör oluşumuna ve tümör progresyonuna dahil olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, miR-196a ve miR-196b'nin anormal ekspresyonunun daha agresif tümör nüksetmesine ve metastaz oluşumuna daha eğilimli hale getirebileceği hipotezi ile uyumludur. CRC'li geniş bir hasta serisinde miR-196a ve miR-196b ekspresyonunun klinik değerini gösteren ilk çalışmadır (Ge ve ark., 2014).

Çalışmamızda miR -196b'nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.5), tümörlü dokularda (8.33) normal dokuya (5.25) oranla daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (1.586 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (8.42, $p<0.003$).



Şekil 4.5. miRNA-196b'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p<0.05$)

Çalışmamızda miR-196b ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmalarla paralel olup miRNA-196b'nin tümörlü dokulardaki yüksek ekspresyondan dolayı onkogenik bir miRNA olabileceğini desteklemiştir.

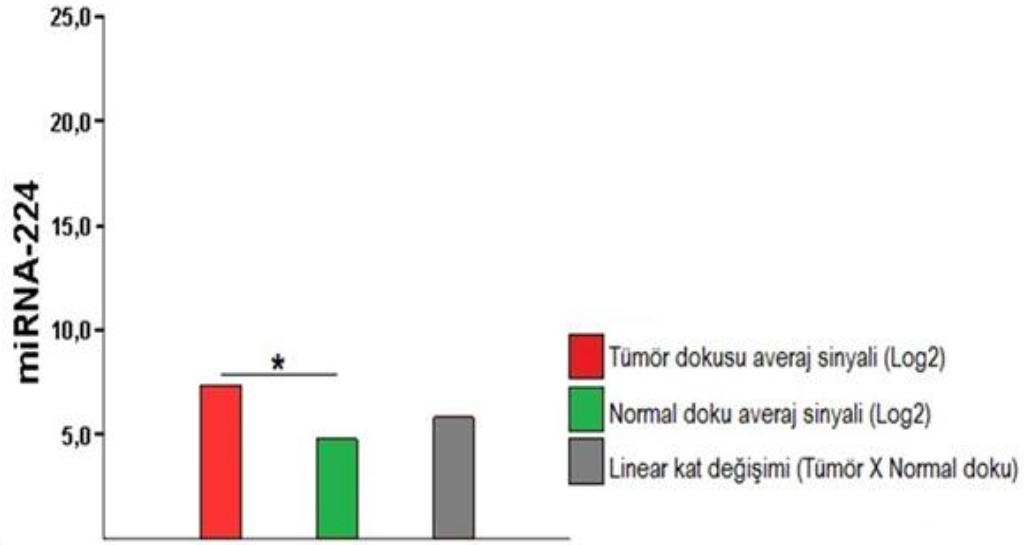
4.5. miR-224'ün Ekspresyon Profili

miR-224'ün hedef genleri SMAD4 ve CDH1 olarak tanımlanmıştır. SMAD4 ve miR-224 ekspresyonu arasında negatif korelasyon gözlemledik. MiR-224'ün aşırı ekspresyonu, hem geçici hem de kararlı miRNA transdüksiyonu üzerinde sırasıyla CDH1 ve SMAD4'ün mRNA'sı ve protein ekspresyonunu azaltmıştır (Ling ve ark., 2016).

Bu çalışmada, CRC kanseri ilerlemesini düzenleyen miR-224'ün biyolojik rolü araştırıldı. SMAD4, sitokinlerin transforme edici büyüme faktörü-y (TGF-y) süper familyasından sinyal vericileri olan evrimsel olarak korunmuş SMAD protein ailesi üyesi olup miR-224'ün hedef geni olduğu tahmin edilmiştir. Sonuçlarımız, SMAD4'ün miR-224 tarafından translasyonel inhibisyon yoluyla baskılandığı ve miR-224'ün CRC hücrelerinin büyümesini, göçünü ve invazyonu geliştirdiğini ortaya koymuştur (Zhang ve ark., 2013).

miR-224'ün hedef geni p21 olduğu tanımlanmıştır. MiR-224'ün p21 ile doğrudan etkileşip etkileşmediğini araştırmak için, bir miR-224 mimik sentetik miRNA'lar kullanılmıştır. Analizlerimizde p21, eşzamanlı olarak miR-224 tarafından downregüle edilen, hücre döngüsünü kontrol eden ve 3'UTR'si içinde bir miR-224 bağlanma alanına sahip olan tek mRNA adayı olarak tanımlanmıştır. p21, sikline bağımlı kinazları 2 ve 4 inhibe ederek G1'den S'ye hücre döngüsü ilerlemesinin ana regülatörü olarak görev yapan bir tümör süpresör genidir. Çalışmamız p21 mRNA'yı iyi bir miR-224 hedef geni olarak doğruladı ve bu da miR-224'ün tümör oluşumuna katkıda bulunabileceği olası bir mekanizma olduğunu düşündürdü (Olaro ve ark., 2014).

Çalışmamızda miR-224'ün mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.6), tümörlü dokularda (7.32) normal dokuya (4.79) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (1.528 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (5.81, $p < 0.003$).



Şekil 4.6. miRNA-224'ün normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)

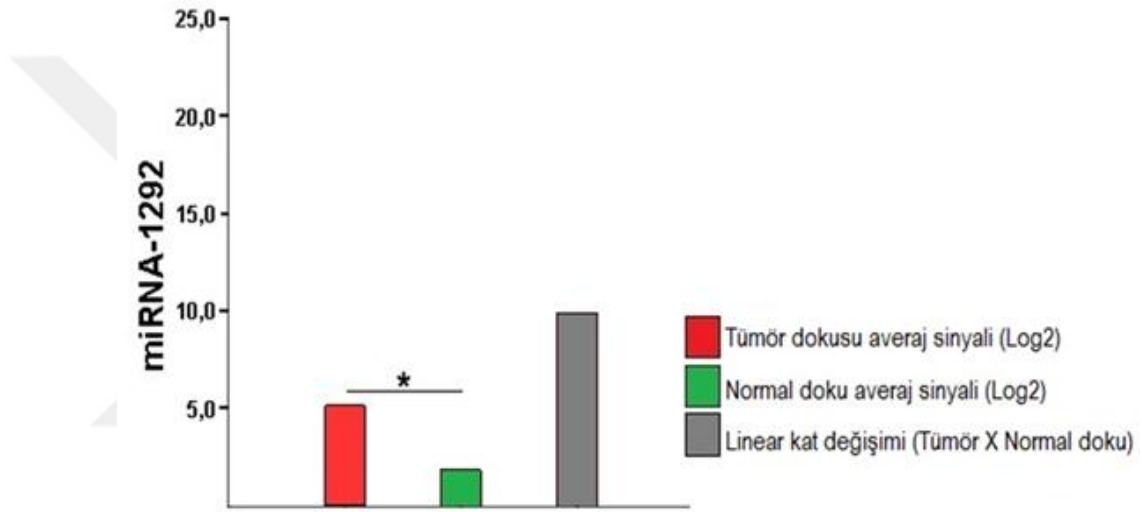
Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen referanslar tarafından gerçekleştirilen çalışmada bildirilen miRNA-224'ün tümörlü dokudaki ekspresyonlarıyla paralel olduğu belirlenmiştir. miRNA-224'ün SMAD4, CDH1 ve p21 gibi birçok hedef geninin olduğu ve miRNA-224'ün yüksek ekspre edilerek hedef genleri baskılandığını ve tümör oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda miRNA-224'ün tümörlü dokudaki ekspresyonuna bakıldığında onkogenik bir miRNA olabileceğini desteklemiştir.

4.6. miR-1292'nin Ekspresyon Profili

miR-1292'nin CRC'li hastalarda ekspresyonu anlamlı olarak daha kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. miR-424-3p, miR-503 ve miR-1292'nin aşırı ekspre edildiği ve bu üç miRNA'nın CKB ve UBA2'nin doğrudan hedefi olduğu fikrini doğrulamıştır. miR-1292 ve diğer iki miRNA'ların aşırı ekspresyonu CKB ve UBA2'nin baskılamasına ve kolorektalizasyonda proliferasyon, adhezyon ve metazdazda rol aldıklarını belirlenmiştir (Torres ve ark., 2017). Yapılan çalışmalara

göre miR-1292'in aşırı ekspre olduğu ve birkaç tümörsupresör geni hedeflediğini düşündürmüştür (Zahang ve ark., 2014).

Çalışmamızda miR -1292'nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.7), tümörlü dokularda (5.12) normal dokuya (1.82) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (2.813 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (9.85, $p < 0.003$).



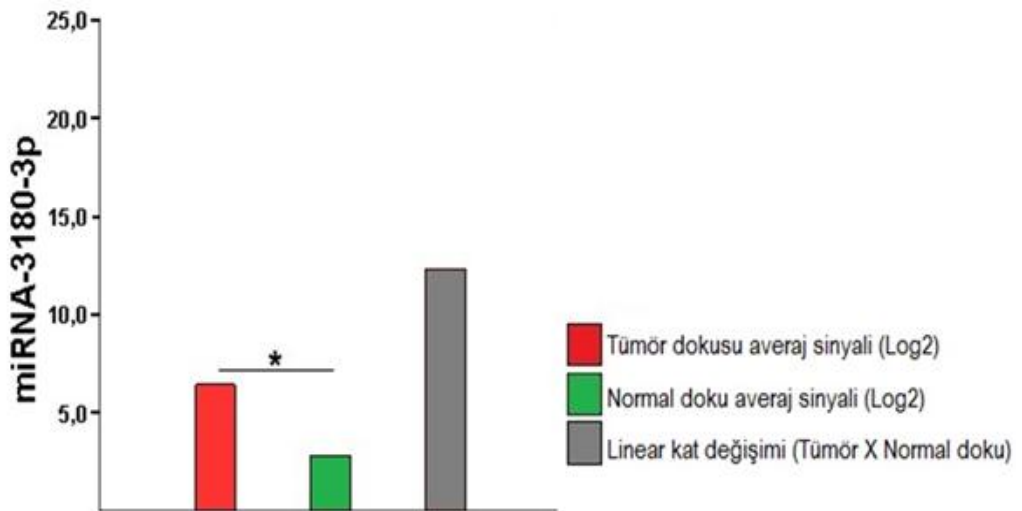
Şekil 4.7. miRNA-1292'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p < 0.05$)

Çalışmamızda miR-1292 ile ilgili elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmalarla paralel olup miR-1292'nin CRC'li hastalarda ekspresyonu anlamlı olarak kötü sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. miR-1292'nin tümörlü dokulardaki yüksek ekspresyonu çalışmamızla paralel olduğundan dolayı onkogenik bir miRNA olabileceği desteklemiştir.

4.7. miR-3180-3p'nin Ekspresyon Profili

miR-3180-3p'nin ekspresyonu ile yapılan çalışmalar sınırlıdır. Yeni deregüle edilmiş metastatik transkriptler, IGKV1 ekspresyonunun azalmasıyla birlikte APOA1, HRG, UGT2B4, RBP4 ve ADH4 mRNAs ve miR-3180-3p, miR-3197, miR-3178, miR-4793 ve miR-4440 miRNA'ların aşırı ekspresyonunu içermiştir. Kolorektal kanser hastalarından alınan karaciğer metastazlarının genomik karakterizasyon çalışmasında miR-3180-3p'nin aşırı ekspre edildiği (up) reüle edildiği belirlendi (Sayagues ve ark., 2016). Başka bir çalışmada CRC de miRNA'ların diferansiyel ekspresyonu normal ve tümörlü mukozda karşılaştırıldığında miR-3180-3p'nin ekspresyonun artmış (up) olduğu tespit edildi (Hamjiord ve ark., 2012). Kolorektal kanserde miRNA'ların ve ROS'un potansiyel rolleri: tanısal biyobelirteçler ve terapötik hedefler çalışmasında miR-3180-3p tümör dokusunda aşırı ekspre edildiği belirlenmiştir (Lin ve ark., 2017).

Çalışmamızda miR-3180-3p'nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.8), tümörlü dokularda (6.42) normal dokuya (2.8) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (2.292 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (12.32, $p < 0.003$).



Şekil 4.8. miRNA-3180-3p'nin normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p < 0.05$)

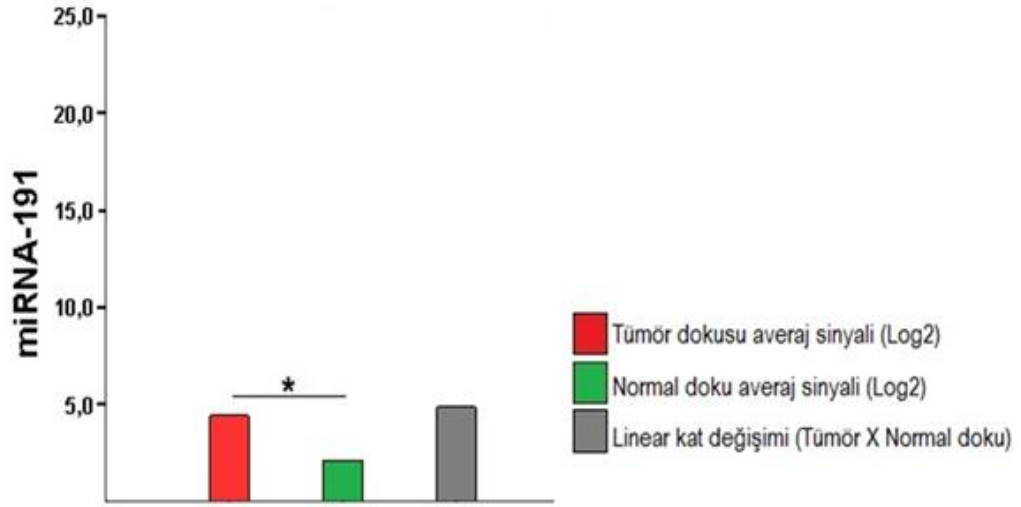
Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen çalışmalarla paralel olduğu desteklenmiştir. miR-3180-3p'nin fonksiyonu hakkında çok az referans olmasına rağmen tümörlü dokulardaki ekspresyonu ile çalışmamızdaki ekspresyonuna bakıldığında miR-3180-3p'nin yüksek seviyede ekspre olduğundan onkogenik bir miRNA olabileceğini tahmin etmekteyiz.

4.8. miR-191'in Ekspresyon Profili

miR-191'in kolorektal kanserde nasıl işlediği hala büyük ölçüde belirsizdir. Çalışmalar, miR-191'in doğrudan C/EBP γ mRNA'nın 3'UTR'sine bağlandığını ve mRNA ve C/EBP β 'nin protein ifadesinde bir azalmaya aracılık ettiğini göstermiştir. Bu çalışmada kolon tümör dokularında miR-191'in aşırı ekspresyonu, hücre döngüsü ilerlemesini ve 5-Fu indüklü hücre apoptozuna karşı hücre direncini değiştirir. MiR-191'in inhibisyonunun ise bir ksenograft modelinde hücre büyümesi, proliferasyon ve tümörjenisitenin azalmasına yol açtığını göstermekteyiz. Sonuç olarak aşırı ekspre olan miR-191, C/EBP β hedefleme yoluyla insan kolorektal kanserinin tümörjenezini artırır (Zhang ve ark., 2015).

Bu çalışmada, 24 normal ve kolorektal kanser hastası örneğinde 10 olgun miRNA'nın in vivo önemi değerlendirildi. Bu on miRNA'nın p53 ile ilişkili olduğu ve p53 delesyonunu sergileyen tümörlerde yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Hsa-miR-15b, hsa-miR-181b, hsa-miR-191 ve hsa-miR-200c'nin ekspresyonu kolorektal kanser hastalarında anlamlı şekilde fazla sentezlenmiştir ve bunlar hastalığın gelişimi ile ilişkili olabilir. Bizim sonuçlarımıza dayanarak, bu miRNA'ların bazıları, tümörlerde aşırı ekspresyonu nedeniyle onkogenler olarak işlev görebilir (Xi ve Ark., 2006).

Çalışmamızda miR-191'in 3p'nin mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.9), tümörlü dokularda (4.4) normal dokuya (2.12) göre (2.075kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (4.83, $p < 0.003$).



Şekil 4.9. miRNA-191 normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (*p<0.05)

Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen Zhang ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bildirilen miRNA-191'in yüksek ekspresyonunun proliferasyon ve tümörojenezini artırdığı inhibisyonun ise azalttığı belirtilmiştir. Xi ve ark. (2006) yaptığı çalışmada ise miR-191'in p53 ile ilişkili olduğu p53 delesyonunun olduğu tümörlerde yüksek ekspresyon edildiği tespit edilmiştir. Verilerimiz yukarıdaki çalışmalarla paralel olup miR-191'in onkogenik bir miRNA olabileceğini desteklemiştir.

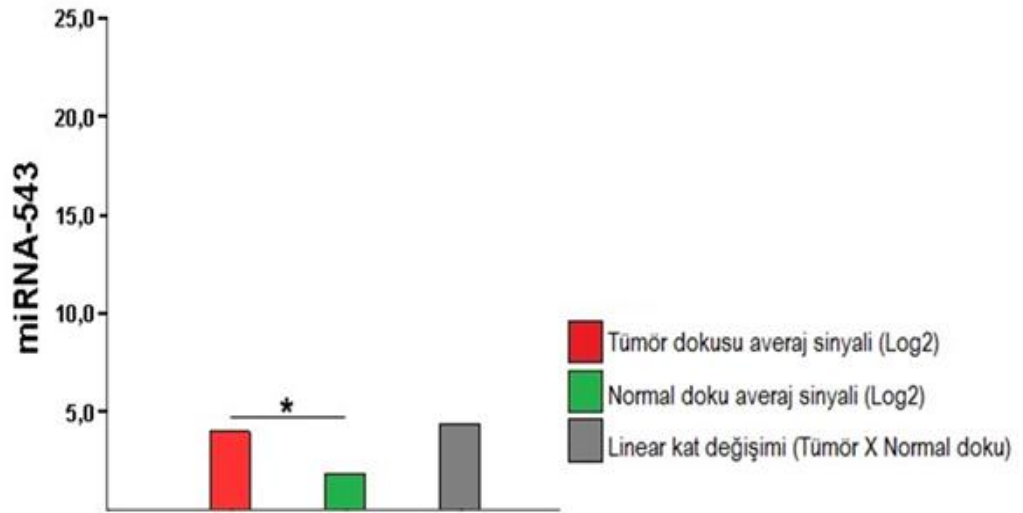
4.9. miR-543'ün Ekspresyon Profili

MiR-543'ün hedef geni KLF4'tür. MiR-543'ün aşırı ekspresyonu KLF4'ü baskıladığını hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu arttırdığını, hücre apoptozunu azalttığını göstermiştir. MiR-543, CRC'de hedef gen KLF4'ü inhibe ederek bir onkojen olarak işlev görür (Zhai ve ark., 2017). PTEN'i doğrudan miR-543 hedefi olarak tanımladık. miR-543'ün, CRC dokularında ve aşırı ekspresyonunu destekleyen tümör hücresi göçü ve invazyonunda yapısal olarak yukarı regüle edildiğini bulduk. Sonuç olarak, çalışmadaki veriler miR-543'ün bir tümör promoteri

olarak davrandığını ve CRC metastazında hayati bir rol oynadığını göstermektedir (Sun ve ark., 2016).

KRAS, MTA1 ve HMGA2'nin miR-543'ün doğrudan hedefleri olduğunu göstermektedir. miR-543 seviyesi ile hedeflerinin, KRAS, MTA1 ve HMGA2'nin ekspresyonu arasında ters bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, miR-543 aşırı ekspresyonu KRAS, MTA1 ve HMGA2'yi hedefleyerek CRC hücrelerinin büyümesini ve metastazını inhibe ettiği belirlendi. Tersine, miR-543'ün demonte edilmesi CRC hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını artırır. Sonuç olarak, çalışmamız KRR, MTA1 ve HMGA2'yi hedef alarak KRC hücre proliferasyonu ve metastazının regülasyonunda tümör baskılayıcı olarak miR-543'ün önemli bir rolü vurgulanmıştır (Fan ve ark., 2016).

Çalışmamızda miR-543'ün mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.10), tümörlü dokularda (4) normal dokuya (1.87) göre daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (2.139 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (4.36, $p < 0.003$).



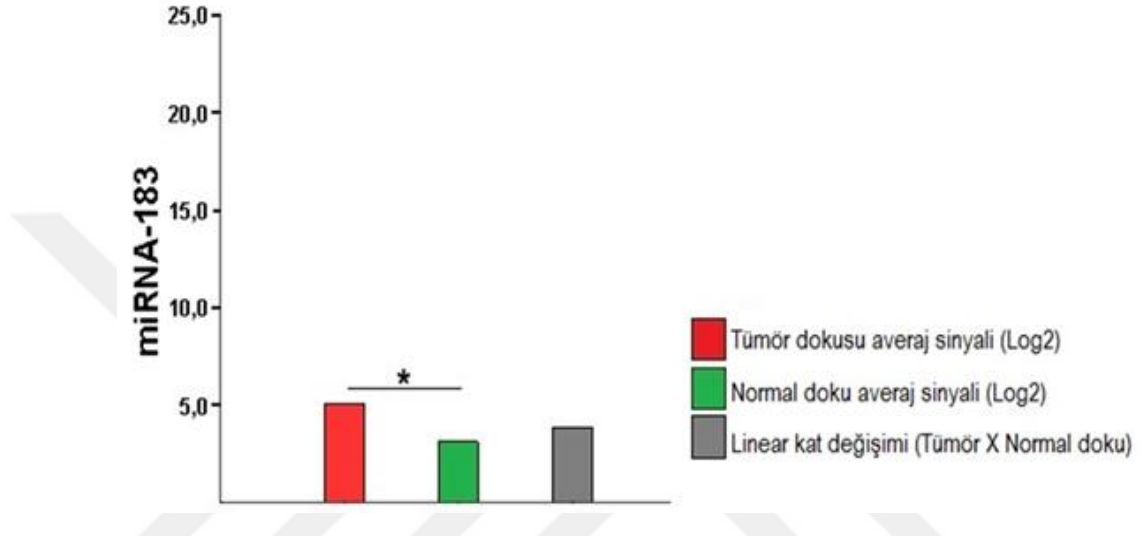
Şekil 4.10. miRNA-543'ün normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p < 0.05$)

Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen Zhai ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bildirilen miRNA-543'ün hedef geni KLF4 olduğu ve yüksek ekspre edildiğinde KLF4'ü inhibe ederek tümör oluşumunu desteklediği belirtilmiştir. Sun ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada miRNA-543'ün PTEN'i hedef aldığı yüksek ekspresyonun PTEN'nin inhibisyonuna neden olduğu ve buda tümörojenezini artırdığı belirlenmiştir. Fan ve ark. (2016) çalışmasında ise miRNA-543'ün farklı bir rolünün olabileceğini göstermiştir. miR-543 aşırı ekspresyonu KRAS, MTA1 ve HMGA2'yi hedefleyerek CRC hücrelerinin büyümesini ve metastazını inhibe ettiği tespit edildi. Bu çalışmada miRNA-543'ün tumor supressör özellik gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamız ise birçok çalışma ile paralel olduğundan miR-191'in onkogenik bir miRNA olabileceğini desteklemektedir.

4.10. miR-183'ün Ekspresyon Profili

ABCA1'in, miR-183'ün hedef genidir. miR-183 aşırı ekspre edildiği ve miR-183'ün kolon kanseri hücrelerinde ABCA1 mRNA'sını bozduğunu doğruladı. Bu nedenle miR-183'ün proliferasyonu desteklediğini ve kolon kanserinde ABCA1'i degrade ederek apoptozisi inhibe ettiği sonucuna vardık (Bi ve ark., 2016). İnsan miR-183/96/182 küme, insan kromozomu 7q32.2 üzerinde bulunur. Bu miRNA'ların kombine ifadesi, tümör patolojisi dahil fizyoloji ve patolojide işlev görebilir. İnsan miR-183/96/182 kümelenmesinin, çeşitli tümör tiplerinde aşırı eksprese edildiği ve bir onkogen olarak hareket ettiği gösterilmiştir (Han ve ark., 2011). miR-183/96/182 küme, insan kromozomu 7q bölgesi üzerinde yer almaktadır. Kolon kanserinde miRNA ekspresyonu araştırılmış, kolon kanseri dokularındaki bu üç miRNA'nın kat değişiklikleri normal dokudakilerle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, miR-183, miR-96 ve miR-182'nin kolon kanseri dokularında nispeten yüksek seviyelerde ifade edildiğini, hücre pliferasyonu inhibisyonunda ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2015).

Çalışmamızda miR-183'ün mikroarray analiz sonucunda (Şekil 4.11), tümörlü dokularda (5.06) normal dokuya (3.12) göre daha daha yüksek düzeyde eksprese edilerek (1.621 kat) yukarı (up) regülasyona uğradığı ve kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (3.86, $p<0.003$).



Şekil 4.11. miRNA-183'ün normal ve tümörlü dokudaki Linear kat değişimlerinin istatistiksel grafiği (* $p<0.05$)

Çalışmamızdan elde edilen veriler, yukarıda bildirilen Bi ve ark. (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada bildirilen miRNA-183'ün hedef geni ABCA1'dir. miRNA-183'ün yüksek ekspresyonu ABCA1 genini inhibisyona uğrattığı ve proliferasyon artışı ve apoptozisin azalmasına neden olduğu belirlenmiştir. Han ve ark. (2011) ile Zhang ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmalarda da miRNA-183'ün yüksek oranda ekspre edildiği hücre proliferasyonu ile inhibisyonuyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada elde ettiğimiz verilerle yapılan çalışmadaki veriler paralel olup miR-183'ün onkogenik bir mikroRNA olabileceğini desteklemiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kolon kanserli olgularda normal doku ve kanserli dokularda eksprese edilen miRNA'lardan, mir-224, mir-1290, mir-27a, mir-543, mir-18b, miR-3180-3p, mir-1292, mir-191, mir-196b ve mir-183'ün tümörlü dokularda normal dokulara göre yukarı regüle olduğunu göstermektedir.

Çalışmada kolon kanserli hastalardan alınan tümörlü dokularla normal dokular kıyaslandığında mir-224'ün (1.528) kat yukarı (up) regülasyona uğradığı, mir-1290'nın (4.466), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-27a'nın (2.814), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-543'ün (2.139), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-18b'nin (2.048),) kat yukarı (up) regülasyona uğradığı miR-3180-3p'nin (2.292), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-1292'nin(2.813), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-191'in (2.075), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-196b'nin (1.586), kat yukarı (up) regülasyona uğradığı mir-183'ün (1.621) kat yukarı (up) regülasyona uğradığı tespit edilmiştir. Bu da belirtilen miRNA'ların onkogenik miRNA olduğu hakkında fikir vermektedir. Mikroarray analiz sonucunda kat değişim düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Keşfinden bu yana her geçen gün daha fazla ilgi odağı olan miRNA'lar günümüzde hızla artan bir öneme sahip hedef spesifik ilaç tedavisi çalışmalar için önem taşımaktadır. mRNA'yı hedef alan terapötik strateji, miRNA'lar üzerinden gen spesifik tedavi yöntemlerini içeren çalışmalar sürdürülmektedir. Son yıllarda, CRC'de anormal miRNA sentezlenmesinden sorumlu mekanizmaları anlamak için önemli gelişmeler kaydedilmiş ve birçok miRNA veya miRNA ailesi, CRC lehine kilit düzenleyiciler olarak tespit edilmiştir. Bazı miRNA'ların CRC hücrelerinde aşırı eksprese edildiği ve tümör baskılayıcı genleri baskılayabileceğine dair bilgiler mevcuttur. CRC teşhisinden sonraki hedef miRNA'ya dayalı tedaviler için onkogenik miRNA'ları inhibe etmek veya tümör baskılayıcı miRNA'ları aktive edilmesi üzerine sürdürülmektedir. Bunun için hedef miRNA'lar ile tamamlayıcı baz eşleştirmesi yoluyla hareket eden tek sarmallı antisens oligonükleotidler

(uzunluğunda yaklaşık 20-22 nükleotid) kullanılarak onkogenik miRNA'ların inhibisyonu yönlendirilebilmesine ya da sentetik miRNA'lar veya ekspresyon vektörleri kullanılarak istenilen tümör baskılayıcı miRNA onkogenik miRNA yerine üretilebilir. Son olarak, onkogenik miRNA ekspresyon düzeylerini düşüren veya kanser önleme için tümör baskılayıcı miRNA ekspresyon düzeylerini arttıran ilaçlar geliştirilebilir (Schetter ve ark., 2013; Chi ve ark., 2016). Kolorektal kanser ve diğer kanser türlerinde hedeflerin gerçekleştirilebilmesi için RNA tabanlı bu uygulamaların geliştirilebilmesi ve miRNA'ların nasıl düzenlendiklerinin, hedeflerini nasıl belirlediklerinin ve biyogenezlerinin çok daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu sayede miRNA'ların gelecekteki kanser tedavisinde fonksiyonlarının araştırılmasındaki ilerlemeler ve teknolojik gelişmeler ilaç endüstrisi ve tıp dünyasında fikir değişmesine neden olacak birçok fizyolojik ve patolojik sürecin aydınlanması sağlanarak, hastalıkların tanısı, prognozu ve tedavi sonrası izlenimlerde yenilikler getirmiş olacaktır. Ayrıca miRNA'lar gelecekteki kanser tedavisinde bir hasta için hangi ilaçların seçileceğine karar vermede ve hastanın ilaca nasıl bir cevap verip vermediğinin belirlenmesinde önemli rol oynayabilecektir (Hayes ve ark., 2014). Çalışma sonucunda elde edilen bulgular da miRNA profillerinin belirlenmesine ışık tutarak bu amaçların tümüne hizmet edilebilecektir.

Sonuç olarak, kolon kanserinde miRNA'ların biyolojik belirteç olarak klinik tanı, erken teşhis ve tedavisinde rol oynayabilmesi için miRNA'ların rollerinin iyi araştırılması gerekmektedir çünkü miRNA'ların her biri, çok sayıda hedef genin ekspresyonunu düzenlemekte ve tek bir miRNA'nın ekspresyonunun değiştirilmesi istenmeyen birçok geni hedef alabilmektedir. Bu durumun tam tersi, tek bir gen birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilmekte, belirli bir miRNA'nın ekspresyonunun değiştirilmesi spesifik bir gen hedefini verimli şekilde etkileyebilmektedir. miRNA tedavi yönteminin başarılı şekilde uygulanabilmesi için daha hassas, hızlı, etkili ve maliyeti düşük yöntemler elde edilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla daha fazla çabaya ve yeni araştırma bulgularına ihtiyaç vardır.

Çalışmada elde edilen bulgular, yapılacak bundan sonraki ileri fonksiyonel çalışmalar için yol gösterici olmakla birlikte, az sayıdaki miRNA' nın değerlendirilmesinden dolayı sınırlıdır. Çok sayıdaki miRNA' nın çok daha fazla sayıdaki örnek ile çalışılmasına olanak sağlayacak daha kapsamlı çalışmaların planlanması hedeflenmelidir.

✓ Mevcut çalışma RNAlater solüsyonu içerisinde fikse edilmiş taze dokular kullanılarak yapılmıştır. Çalışma parafine gömülmüş doku örnekleri ile gerçekleştirilebilir. Böylece dokularla çalışma süresinde kısıtlama ortadan kalkmış olacak farklı miRNA' nın ekspresyon seviyesi incelenecektir.

✓ miRNA ekspresyon profilinin belirlenmesi amacıyla kullanılan farklı metotlarla elde edilen verilerin validasyonun yapılması verilerin güvenilirliğini arttıracaktır.

✓ Kolon dokusundan kana geçebilen bu miRNA' larla biyopsi alınmasına gerek kalmaksızın kan örneği alınarak CRC' ye özgü biyomarkırlar bakımından taranmsı hastalarda invazif risklerinin ortadan kaldırılması açısından daha avantajlı olacaktır.

✓ Çalışma maliyetinin düşürülmesi daha geniş çapta tarama yapılmasına imkan sağlayarak daha geçerli sonuçlara ulaşılmasına olanak sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- AKMAN, H. B., BENSAN, A. E., 2014. Noncoding RNAs and cancer. Dergi Park Turkish Journal of Biology, 817 – 828.
- ANONİM, 2014. Rektum Kanserinde (Kalın Bağırsak Kanserinde) Tarama, <http://www.kolonrektum.com/kalin-bagirsak-kanseri-tarama>, Ankara.
- ANONİM, 2017c. Bağırsak Kanseri, <http://www.taviloglu.com/bagirsak-hastaliklari/bagirsak-kanseri.html>, İstanbul.
- ANONİM, 2017b. İzmir Kolon Kanseri Tedavisi, Kolon Kanseri Hakkında Bilmeniz Gerekenler, <http://www.karatashastanesi.com.tr/hayat/izmir-kolon-kanseri-tedavisi/>, İzmir.
- ANONİM, 2015. Türkiye Kanserle Savaş Vakfı, Alkol ve Kanser, <http://www.kanservakfi.com/alkol-ve-kanser-124.html>, İstanbul.
- ANONİM, 2017d. Kalın bağırsak kanseri için risk faktörleri neler?, <https://indigodergisi.com/2017/05/kalin-bagirsak-kanseri-risk-faktorleri/>, İstanbul.
- ANONİM, 2018b. Kolon ve Rektum Kanseri İçin Risk Faktörleri Nelerdir, <http://www.fezayarbugkarakayali.com.tr/hastaliklar/kolon-ve-rektum-kanseri/kolon-ve-rektum-kanseri-icin-risk-faktorleri-nelerdir/>, İstanbul.
- ANONİM, 2007. Mikroarray ve Mikrodizin Teknolojisi, <http://www.harabe.net/topic/12921-microarray-mikrodizin-teknolojisi/>.
- ANONİM, 2017a. T.C Sağlık Bakanlığı, Kanser Önleme Çalışmaları, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/haberler/324-kal%C4%B1n-ba%C4%9F%C4%B1rsak-kanseri-kolorektal-kanser.html>, Ankara.
- ANONİM, 2018a. T.C Sağlık Bakanlığı, Kalın Bağırsak Kanseri (Kolorektal Kanseri), <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/haberler/324-kal%C4%B1n-ba%C4%9F%C4%B1rsak-kanseri-kolorektal-kanser.html>, Ankara.
- ANONİM, 2016. Kolon ve Rektum Kanseri: Tanı-Tedavi, <http://www.mustafabenekli.com/kolorektal-kanser-tan%C4%B1-tedavi.html>, Ankara.
- ARSLAN, S., 2000. Kanserli Hastalarda Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, s84.
- BA, S., XUAN, Y., LONG, Z. W., CHEN, H. Y., ZHENG, SS., 2017. MicroRNA-27a Promotes the Proliferation and Invasiveness of Colon Cancer Cells by Targeting SFRP1 through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. Cell Physiol Biochem, (5): 1920-1933.
- BALKAN, F., USLUOĞULLARI, C.A., 2015. Metabolik Sendromda Kanseri Riski Artar mı?. Gaziantep Tıp Araştırmaları Dergisi, 13(3):147-150.
- BAXTER, NN., TEPPER, JE., DURHAM, SB., 2005. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. Gastroenterology, 128:819.
- BENEK, S., TATAR, C., KOCAKUSAK, A., OZER, B., KIZILKAYA, M. C., AYDIN, H., 2016. The Effect of Demographic, Biochemical and Pathological Parameters on Survival in Colorectal Cancer. Haseki Training and Research Hospital Department of General Surgery, İstanbul Turkey, 10.5455.
- BIRD, R. P., YAO, K., LASKO, C. M., 1996. Inability Of Low-Or High-Fat Diet To Modulate Late Stages Of Colon Carcinogenesis in Sprague-Dawley Rats. Cancer Res, 56(13): 2896.

- BI, D.P., YIN, C.H., ZHANG, X.Y., YANG, N.N., XU, J.Y., 2016. MiR-183 functions as an oncogene by targeting ABCA1 in colon cancer. *Oncol Rep*, 35(5): 2873.
- BINI, E.J., PARK, J., FRANCOIS, F., 2006. Use of flexible sigmoidoscopy to screen for colorectal cancer in HIVinfected patients 50 years of age and older. *Arch Intern Me*, 166: 1626.
- BOTTERI, E., IODICE, S., BAGNARDI, V., 2008. Smoking And Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Jama*, 300: 2765.
- BURNETT, H. AN., NEWCOMB, PA., POTTER, JD., 2008. Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17: 2970.
- CALIN, G. A., 2002. Frequent Deletions and Downregulation of Microrna Genes Mir15 and Mir16 at 13q14 In Chronic Lymphocytic Leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America*, 99: 15524-15529.
- CALIN, G. A., CROCE, C. M., 2006. MicroRNA- Cancer Connection: The Beginning of a New Tale. *Cancer Res*, 66(15): 7390-7394.
- CALIN, G. A., LIU, C. G., SEVIGNANI, C., FERRACIN, M., FELLI, N., DUMITRU, C. D., SHIMIZU, M., CIMMINO, A., ZUPO, S., DONO, M., DELL'AQUILA, M. L., ALDER, H., RASSENTI, L., KIPPS, T. J., BULLRICH, F., NEGRINI, M., CROCE, C. M., 2004. MicroRNA Profiling Reveals Distinct Signatures in B Cell Chronic Lymphocytic Leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 101(32): 11755-11760.
- CALIN, GA., DUMITRU, CD., SHIMIZU, M., BICHI, R., ZUPO, S., NOCH, E., ALDLER, H., RATTAN, S., KEATING, M., RAI, K., RASSENTI, L., KIPPS, T., NEGRINI, M., BULLRICH, F., CROCE, CM., 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 26;99(24): 15524-9.
- CHI, Y., ZHOU, D., 2016. MicroRNAs in colorectal carcinoma: from pathogenesis to therapy. *J. ExpClin Cancer Res*, 35(1): 43-44.
- CHLEBOWSKI, R. T., WACTAWSKI-WENDE, J., RITENBAUGH, C., 2004. Estrogen Plus Progestin and Colorectal Cancer in Postmenopausal Women. *N Engl J Med*, 350: 991.
- CHOI, S., 2004. DNA Chips and Microarray Analysis, *Handbook of fungal biotechnology*, Marcel Dekker, Inc,86-150.
- CHRISTINE, A., LACUBUZIO, D., ELIZABETH, M., 2005. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrointestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, 367-394.
- COWLAND, J. B., HOTHER, C., GRONBAEK, K., 2007. MicroRNAs and Cancer. *Apmis*, 115: 1090 –1106.
- CUCCHINI, S., THOMPSON, A., HINTON, J. C. D., 2001. Microarrays for Microbiologists, *Microbiology*, 147: 1403-1414.
- DÖNMEZ, N., YILDIRIM, M., ARSLAN, P., 2012. Obezite ve Kanser, Hacettepe Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, s20.

- DOBRUCALI, A., 2003. Kolorektal kanserde sınıflama and etyopatogenez. Kolon, rektum and anorektal bölge hastalıkları, Tasarım yayıncılık, İstanbul, s:395-412.
- EDWARDS, B. K., WARD, E., KOHLER, B. A., EHEMAN, C., ZAUBER, A. G., ANDERSON, R. N., JEMAL, A., SCHYMURA, M. J., LANSDORP-VOGELAAR, I., SEEFF, L. C., VAN BALLEGOIJEN, M., GOEDE, S. L., RIES, L. A., 2010. Annual Report To The Nation on The Status of Cancer, Featuring Colorectal Cancer Trends And Impact of Interventions (Risk Factors, Screening, And Treatment) To Reduce Future Rates. *Cancer*, 1;116(3): 544-73.
- EIS, P.S., TAM, W., SUN, L., CHADBURN, A., LI, Z., GÖRMEZ, M.F., LUND, E., DAHLBERG, J.E., 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 02(10): 3627–3632.
- EKBOM, A., HELMICK, C., ZACK, M., ADAMI, HO., 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 323: 1228.
- ESQUELA, K. A., SLACK, FJ., 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6(4): 259-69.
- FANTINI, S., SALSÌ, V., REGGIANI, L., MAIORANA, A., ZAPPAVIGNA, V., 2017. The miR-196b miRNA inhibits the GATA6 intestinal transcription factor and is upregulated in colon cancer patients. *Oncotarget*, (3): 4747-4759.
- FERLAY, J. S., ERVIK, M., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D., BRAY, F., 2012. Kanseri Dünya çapında: Kanser Araştırmaları için Lyon, Fransa: International Agency; Globocan, 47-68.
- GE, J., CHEN, Z., LI, R., LU, T., XIAO, G., 2014. Upregulation of microRNA-196a and microRNA-196b cooperatively correlate with aggressive progression and unfavorable prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Cell Int*, (1): 128.
- GÖNEN, Ö., 2004. Kolorektal Kanser Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Surgery*, 9:57-65.
- GREGORY, RI., CHENDRIMADA, TP., COOCH, N., SHIEKHATTAR, R., 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 18;123(4): 631-40.
- HAMFJORD, J., STANGELAND, AM., HUGHES, T., SKREDE, ML., TVEIT, KM., IKDAH, T., KURE, EH., 2012. Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PLoS One*, (4): 34150.
- HAYES, J., PERUZZI, PP., LAWLER, S., 2014. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*, 20(8): 460-9.
- IORIO, M. V., FERRACIN, M., LIU, C. G., 2005. MicroRNA Gene Expression Deregulation In Human Breast Cancer. *Cancer Res*, 65: 7065–7070.
- IORIO, M. V., VISIONE, R., DI, L. G., DONATI, V., PETROCCA, F., CASALINI, P., TACCIOLI, C., VOLINIA, S., LIU, C. G., ALDER, H., CALIN, G. A., MENARD, S., CROCE, C. M., 2007. MicroRNA Signatures In Human Ovarian Cancer. *Cancer Res*, 67(18): 8699-8707.
- IORIO, V.M., FERRACIN, M., LIU, C.G., VERONESE, A., SPIZZO, R., SABBIONI, S., MAGRI, E., PEDRIALI, M., MANUELA F., SYLVIE C., PALAZZO, M.J., ROSENBERG, A., MUSIANI, P., VOLINIA, NENCI, S.I., CALIN, G.A., QUERZOLI, P., NEGRINI, M., CROCE, C.M., 2005.

- MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. Published, 05-1783.
- IPEKDAL, K., 2006. Mikroarray Teknolojisi Evrimsel Ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_mikroarrayandecol og y.pdf [Ziyaret tarihi: 01.11.2012].
- IZMIRLI, M., ALTIN, S., DERNEK, B., UNSAL, M., 2007. SSK Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Onkoloji Merkezinin 1999-2004 yılları kanser istatistikleri. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(4): 172-82.
- JOHNSON, S. M., GROSSHANS, H., SHINGARA, J., 2005. RAS is Regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120: 635-647.
- KARACA, M., ONUS, A. N., 2004. Array Gen Expresyon Teknolojisi Ve Bitkisel Üretimde Kullanımı. *Alatarım*, 3: 5-10.
- KARAGÜN, B.Ş., ANTMEN, B., ŞAŞMAZ, İ., KILINÇ, Y., 2014. Mikro RNA ve Kanser. *TürkiyeTürk Klinik Biyokimya Dergisi*, 12(1): 45-56.
- KAYA, A., GEDİK, V.T., BAYRAM, F., BAHÇECİ M., SABUNCU, T., TUZCU, A., ARIKAN, Ş., GÖKALP, D., 2009. Hipertansiyon, Obezite Ve Lipid Metabolizması Hekim İçin Tanı Ve Tedavi Rehberi. *Bayt*, 1-97.
- KELLECI, M., 2005. Kanser Hastalarının Umudunun Geliştirilmesine Yönelik Hemşirelik Girişimleri. *Anadolu Psikiyatri Dergisi*, 6: 41-47.
- KEMPERS, MJ., KUIPER, RP, OCKELOEN, CW., 2011. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol*, 12: 49.
- KUMAR, V., ABBAS, AK., FAUSTO, N., 2005. The gastrointestinal tract. In *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7 th. Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Company*, 857-869.
- KUŞAKÇIOĞLU, Ö., 2003. *Kolorektal Kanser Hastalıkları. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri*, s27.
- LAGOS, Q.M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W., TUSCHL, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 26;294(5543): 853-8.
- LARSSON, S. C., BERGKVIST, L., WOLK, A., 2005. Magnesium İntake İn Relation To Risk Of Colorectal Cancer İn Women. *JAMA*, 293:86.
- LEE, RC., FEINBAUM, RL., AMBROS, V., 1993. The C. Elegans heterochronic gene Lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5): 843.
- LIN, C. C., LAI, Y. L., WARD, S. E., 2003. Effect of Cancer Pain on Performance Status, Mood States, and Level of Hope Among Taiwanese Cancer Patients. *J. Pain. Symptom. Manage*, 25 (1): 29-37.
- LI, Y., CHEN, M., LIU, J., LI, L., YANG, X., ZHAO, J., WU, M., YE, M., 2017. Upregulation of MicroRNA 18b Contributes to the Development of Colorectal Cancer by Inhibiting CDKN2B. *Mol Cell Biol*, (22): 391-17.
- LIN, J., CHUANG, CC., ZUO, L., 2017. Potential roles of microRNAs and ROS in colorectal cancer: diagnostic biomarkers and therapeutic targets. *Oncotarget*, (10): 17328-17346.
- LING, H., PICKARD, K., IVAN, C., ISELLA, C., IKUO, M., MITTER, R., SPIZZO, R., BULLOCK, M., BRAICU, C., PILECZKI, V., VINCENT, K., PICHLER, M., STIEGELBAUER, V., HOEFLER, G., ALMEIDA, MI., HSIAO, A., ZHANG, X., PRIMROSE, J., PACKHAM, G., LIU, K., BOJJA,

- K., GAFÀ, R., XIAO, L., ROSSI, S., SONG, JH., VANNINI, I., FANINI, F., KOPETZ, S., ZWEIDLER-MCKAY, P., WANG, X., IONESCU, C., IRIMIE, A., FABBRÌ, M., LANZA, G., HAMILTON, SR., BERINDAN-NEAGOE, I., MEDICO, E4., MIRNEZAMI, A., CALIN, GA., NICOLOSO, MS., 2016. The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis. *Gut*, (6): 977-989.
- LUK, G. D., 1999, Malignant tumors of the colon. In: Brandt LJ. *Clinical Practice of Gastroenterology*, Philadelphia, Current Medicine, Inc, s762-72.
- LUND, E., GUTTINGER, S., CALADO, A., DAHLBERG, JE., KUTAY, U., 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2;303(5654): 95-8.
- MA, Q., WANG, Y., ZHANG, H., WANG, F., 2017. MiR-1290 Contributes to Colorectal Cancer Cell Proliferation by Targeting INPP4B. *Oncol Res*, 21.
- MADHU, S., Kumar, S. J., Erkeland, R. E., 2008. Suppression of Non-Small Cell Lung Tumor Development by the Let-7 Mirorna Family. *Pnas March*, 105; 10: 3903-3908.
- MAJERUS, E., BIRNBAUM, E., PICUS, J., 2002. Colorectal Malignancies. in: Govindan R, Arquette M (Eds.). *The Washington Manual of Oncology*, 191-202.
- MEYSKENS, FL., MCLAREN, CE., PELOT, D., 2008. Difluoromethylornithine plus sulindac for the prevention of sporadic colorectal adenomas: a randomized placebo-controlled, double-blind trial. *Cancer Prev Res (Phila)*, 1: 32.
- MICHAEL, M. Z., O' CONNOR, S. M., VAN HOLST PELLEKAAN, N. G., YOUNG, G. P., JAMES, R. J., 2003. Reduced Accumulation of Specific Micrnas in Colorectal Neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1: 882-891.
- NORAT, T., BINGHAM, S., FERRARI, P., 2005. Meat, Fisch And Colorectal Cancer Risk: The European Prospective Investigation Into Cancer And Nutrition. *J Natl Cancer*, 97(12): 906-16.
- OLARU, AV., YAMANAKA, S., VAZQUEZ, C., MORI, Y., CHENG, Y., ABRAHAM, JM., BAYLESS, TM., HARPAZ, N., SELARU, FM., MELTZER, SJ., 2013. MicroRNA-224 negatively regulates p21 expression during late neoplastic progression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, (3): 471-80.
- ROSEN, P., FIREMAN, Z., FIGER, A., 1986. Colorectal Tumor Screening In Women With A Past History of Breast, Uterine,Or Ovarian Malignancies. *Cancer*, 57: 1235-9.
- ROTHSCHILD, S., 2014. microRNA therapies in cancer. Received, 20142: 7.
- SAVLI, H., 2003, DNA 'chip' Teknolojisi, KLİNİK XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji Ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 30 Mart-3 Nisan 2003, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AB Dalı, s121-122.
- SAYAGUÉS, JM., CORCHETE, LA., GUTIÉRREZ, ML., SARASQUETE, ME., DEL MAR ABAD, M., BENGOCHEA, O., FERMÍÑÁN, E., ANDUAGA, MF., DEL CARMEN, S., IGLESIAS, M., ESTEBAN, C., ANGOSO, M., ALCAZAR, JA., GARCIA, J., ORFAO, A., MUÑOZ-BELLVIS, L., 2016. Genomic characterization of liver metastases from colorectal cancer patients. *Oncotarget*, (45): 72908-72922.
- SAYDAM, F., DEĞİRMENCİ, İ., GÜNEŞ, H.V., 2010. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38 (1): 113-120.

- SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W., BROWN, P. O., 1995. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns With a Complementary DNA Microarray. *Science*, 270 (5235): 467-70.
- SCHETTER, A.J., OKAYAMA, H., and HARRIS, C.C., 2012. The Role of microRNAs. *Cancer J*, 18(3):244-52.
- SHENOUDA, SK., ALAHARI, SK., 2009. MikroRNA function in cancer: oncogen or a tumor supressor. *Review*, 28: 369-378.
- SPIRİO, L., OLSCHWANG, S., GRODEN, J., 1993. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 75: 951.
- STEWART, M., MACRAE, FA., WILLIAMS, CB., 1982. Neoplasia and ureterosigmoidostomy: a colonoscopy survey. *Br J Surg*, 69: 414.
- STROHLE, A., MAIKE, W., HAHN, A., 2007. Nutrition And Colorectal Cancer. *Med Monatsschr Pharm*, 30: 25-32.
- TARHAN, O. R., SARICIK, B., 2015. Laparoskopik Inguinal Herni Onarımı. *Türkcerrahi*, s19.
- THUN, M. J., NAMBOODIRI, M. M., HEATH, C. W., 1991. Jr. Aspirin Use and Reduced Risk of Fatal Colon Cancer. *N Eng J Med*, 1593-6.
- TORRES, S., GARCIA-PALMERO, I., BARTOLOMÉ, RA., FERNANDEZ-ACEÑERO, MJ., MOLINA, E., CALVIÑO, E., SEGURA, MF., CASAL, JI., 2017. Combined miRNA profiling and proteomics demonstrates that different miRNAs target a common set of proteins to promote colorectal cancer metastasis. *J Pathol*, (1): 39-51.
- TURHAL, N. S., 2008. Kolon Kanseri (Kalın Bağırsak Kanseri): Tanı, Belirtiler ve Tedavi, *Tavsiyeediyorum.com Kütühanesi*, s18.
- UNER, A., 2003. Array Teknolojileri ve Onkolojide Kullanım Alanları. XV. 2003. Ulusal Kanser Kongresi. 19-23 Nisan. Antalya, s52.
- VASEN, HF., WATSON, P., MECKLIN, JP., 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116:1453-6.
- WIGHTMAN, B., LLHO, HA., RUVKUN, G., 1993. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *W-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans* Bruce Wightman, tllho Ha and Gary Ruvkun Department of Molecular Biology. *Cell Press*, 3;75(5):855-62..
- WOLIN, K. Y., YAN, Y., COLDITZ, G. A., 2009. Physical Activity And Colon Cancer Prevention: A Meta-Analysis. *Br J Cancer*, 100: 611.
- WU, J., JI, X., ZHU, L., JIANG, Q., WEN, Z., XU, S., SHAO, W., CAI, J., DU, Q., ZHU, Y., MAO, J., 2013. Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett*, (2): 155-63.
- Xİ, Y., FORMENTİNİ, A., CHİEN, M., WEİR, DB., RUSSO, JJ., JU, J., KORNMANN, M., JU, J., 2006. Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights*, 2: 113-121.
- YILDIZ, K., 2008. Evre 1-III kolon kanserinde prognostik faktörlerin araştırılması. *Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi*, Edirne, 3-16.
- YOKUŞ, B., ÜLKER, D.Ü., 2012. Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1(2): 7-18.

- ZHANG, GJ., ZHOU, H., XIAO, HX., LI, Y., ZHOU, T., 2013. Up-regulation of miR-224 promotes cancer cell proliferation and invasion and predicts relapse of colorectal cancer. *Cancer Cell Int*, (1): 104.
- ZHANG, XF., LI, KK., GAO, L., LI, S., CHEN, K., ZHANG, JB., WANG, D., TU, RF., ZHANG, JX., TAO, KX6., WANG, G., ZHANG, XD., 2015. miR-191 promotes tumorigenesis of human colorectal cancer through targeting C/EBP β . *Oncotarget*, (6): 4144-58.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sema ATMANOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : SİVEREK /23.11.1987
Telefon : 0545 417 27 04
e-mail : sema.atmanoglu@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe,İl	Bitirme Yılı
Lise	: Siverek Karacadağ Anadolu Lisesi	2004
Üniversite	: Harran üniversitesi Haliliye/ŞANLIURFA	2014
Yüksek Lisans	: Harran Üniversitesi Haliliye /ŞANLIURFA	2018

Doktora : -

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI : Fen, Biyoloji

YABANCI DİLLER : -

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER : -

YAYINLAR : -