

ARALIK 2022

Yüksek Lisans Tezi-Biyoloji

ERKAN ELİHAN

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARIN
DOKULARINDA miR-564 ve miR-718 EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKAN ELİHAN
ARALIK 2022

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARIN DOKULARINDA miR-564
ve miR-718 EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Türkan GÜRER

İkinci Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Deniz MIHÇIOĞLU

Erkan ELİHAN

Aralık 2022



©2022[ERKAN ELİHAN]

**KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARIN DOKULARINDA miR-564 ve
miR-718 EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

başlıklı bu çalışma, **Erkan ELİHAN** tarafından hazırlanmış ve yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Gaziantep Üniversitesi** **Biyoloji'de** Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet İshak YÜCE
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

.....

Prof. Dr. Canan CAN
Biyoloji Bölüm Başkanı

.....

Dr. Öğr. Üyesi Türkan GÜRER
Danışman, Biyoloji
Gaziantep Üniversitesi

.....

Dr. Öğr. Üyesi Deniz MIHÇIOĞLU
İkinci Danışman, Beslenme ve Diyetetik
SANKO Üniversitesi

.....

Sınav Tarihi: 29 Aralık 2022

Jüri Üyeleri:

Dr. Öğr. Üyesi Türkan GÜRER
Danışman, Biyoloji
Gaziantep Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Biyoloji
Gaziantep Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Zafer ÇETİN
Tıbbi Biyoloji
SANKO Üniversitesi

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilmek suretiyle tezde yer aldığını beyan ederim.

Erkan ELİHAN

ABSTRACT

INVESTIGATION OF miR-564 and miR-718 EXPRESSION LEVELS IN TISSUES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

ELİHAN, Erkan

M.Sc. in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Türkan GÜNER

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Deniz MIHCIOĞLU

December 2022

66 pages

Colorectal cancer is responsible for approximately one in every 10 cancer cases and deaths. In addition to environmental effects, colorectal cancer is caused by multiple genetic and epigenetic changes. MicroRNAs are endogenous RNA molecules that post-transcriptionally regulate protein-coding genes. Numerous studies have been conducted showing that dysregulated miRNA expression profiles are associated with many types of cancer. The aim of this study was to determine the relationship between colorectal cancer and expression levels of miR-564 and miR-718. In our study, healthy tissue samples with tumor and adjacent to the tumor, which were obtained voluntarily by signing the consent form of 80 patients with colorectal cancer, were analyzed. This study was approved by the decision of the Medical Ethics Committee of Gaziantep University Faculty of Medicine, numbered 2021/83. miRNAs were isolated from tumor and surrounding healthy tissues of colorectal cancer patients, cDNA synthesis was performed from these miRNAs, and qRT-PCR method was used to determine the expression levels of miR-564 and miR-718. As a result of the study, it was determined that miR-564 and miR-718 expressions in tumor tissues were significantly decreased compared to normal tissues ($p<0.05$). Consequently, it can be concluded that both miR-564 and miR-718 play a tumor suppressor role in the formation of colorectal carcinogenesis.

Key words: Colorectal Cancer, miR-718, miR-564, MicroRNA, qRT-PCR

ÖZET

KOLOREKTAL KANSERLİ HASTALARIN DOKULARINDA miR-564 VE miR-718 EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİHAN, Erkan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Türkan GÜRER

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deniz MIHÇIOĞLU

Aralık 2022

66 sayfa

Kolorektal kanser yaklaşık olarak her 10 kanser vakasından ve ölümünden birinin sorumlusudur. Kolorektal kansere çevresel etkilerin yanı sıra, çoklu genetik ve epigenetik değişiklikler sebep olmaktadır. MikroRNA'lar, protein kodlayan genleri posttranskripsiyonel olarak düzenleyen endojen RNA molekülleridir. Düzensiz miRNA ekspresyon profillerinin birçok kanser türü ile ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı bu mikroRNA'lardan ikisi olan miR-564 ve miR-718'in ekspresyon düzeyleri ile kolorektal kanser arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Çalışmamızda kolorektal kanserli 80 hastanın rıza onam formu imzalatılarak gönüllü şekilde alınmış olan tümörlü ve tümörün bitişiğindeki sağlıklı doku örnekleri analiz edilmiştir. Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 2021/83 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Kolorektal kanser hastalarının tümörlü ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokularından miRNA'lar izole edilerek bu miRNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır ve miR-564 ile miR-718'in ekspresyon düzeylerini saptamak için qRT-PCR metodu kullanılmıştır. Çalışma sonucunda tümörlü dokulardaki miR-564 ve miR-718 ekspresyonlarının normal dokulara göre anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, hem miR-564 hem de miR-718'in kolorektal karsinogenez oluşumunda tümör baskılayıcı rol oynadığı sonucuna varılabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolorektal Kanser, miR-718, miR-564, MikroRNA, qRT-PCR



“Canım aileme”

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Dr. Öğr. Üyesi Türkan GÜRER'e, sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezime verdiği kıymetli katkılarından dolayı ikinci tez danışmanı hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz MIHÇIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullandığımız örneklerin toplanmasına ve klinik verilerin analiz edilmesine sağladığı katkılardan dolayı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alper AYTEKİN'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimine (FEF.YLT.21.13 no'lu proje) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince beni hep destekleyen ve güvenen çok sevdiğim arkadaşım Ömer UÇMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER LİSTESİ.....	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM I: GİRİŞ.....	1
1.1 Kanser	1
1.2. Kolorektal Kanser	4
1.2.1. Kanser Evreleme, TNM Yöntemi ve Kolorektal Kanserin Gelişimi.....	4
1.2.2. Kolorektal Kanserin Epidemiyolojisi.....	8
1.2.3. Kolorektal Kanserin Genomik İnstabilitesi.....	10
1.2.3.1. Kromozomal İnstabilite (CİN)	10
1.2.3.2. Mikrosatellit İnstabilitesi (MSİ)	11
1.2.4. Kolorektal Kanserin Moleküler Yolakları	12
1.2.5. Kolorektal Kanserin Etiyolojisi.....	15
1.3. Mikro Rna (miRNA)'lar	19
1.3.1. miRNA'ların Keşfi.....	19
1.3.2. miRNA'ların Yapısı ve Görevleri	20
1.3.3. miRNA Biyogenezi.....	20
1.3.4. miRNA'ların Lokalizasyonu	25
1.3.4.1. Nükleer miRNA Lokalizasyonu.....	25
1.3.4.2. Ekstraselüler miRNA Lokalizasyonu.....	25
1.3.5. miRNA Genlerinin Konumu ve Organizasyonu	25

1.3.6. miRNA'ların Kararlılığının, Degredasyonunun ve Döngüsünün (Turnover) Düzenlenmesi.....	26
1.3.7. miRNA Dizi Modifikasyonları	28
1.3.8. miRNA'nın Viral Düzenleyicileri.....	29
1.3.9. miRNA Hedef Bölgelerinin Düzenlenmesi	29
1.3.10. Mikro RNA'lar ve Kanser.....	30
1.3.10.1. Tümör Baskılayıcı miRNA'lar.....	32
1.3.10.2. Onkogenik miRNA'lar (OnkomiR)	33
1.4. Çalışmanın Amacı.....	33
BÖLÜM II: LİTERATÜR ÖZETLERİ	35
2.1. miR-564	35
2.2. miR-718	39
BÖLÜM III: MATERYAL VE METOD.....	44
3.1. Doku Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	44
3.2. Dokudan RNA izolasyonu	44
3.3. miRNA'dan cDNA eldesi	44
3.4. Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	45
3.5. İstatistiksel Analizler ile Verilerin Değerlendirilmesi	45
BÖLÜM IV: BULGULAR.....	46
4.1. Doku Örneklerinin Klinik ve Patolojik Verileri.....	46
4.2. Kolorektal Kanserli Hastaların Dokularındaki miR-564 ve miR-718 Ekspresyon Düzeyleri.....	48
4.3. miR-564 ve miR-718 Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Korelasyon.....	49
BÖLÜM V: TARTIŞMA.....	51
BÖLÜM VI: SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ (CV).....	66

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1	2020 Yılı insidansı ve mortalitesi en yüksek olan ilk 10 kanser türündeki vakalar ve ölümler.....	9
Tablo 4.1	miR-564 ve miR-718 ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman korelasyon testi.....	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	Ölüm sebepleri sıralaması dünya istatistikleri.....	2
Şekil 1.2	Ölüm sebepleri sıralaması türkiye istatistikleri	3
Şekil 1.3	Kolorektal kanserin gelişimi.....	7
Şekil 1.4	Kolorektal kanserin genetik modeli.....	8
Şekil 1.5	MikroRNA biyogenezi.....	22
Şekil 4.1	Hastaların klinik, demografik ve patolojik dataları.....	48
Şekil 4.2	miR-564'ün relatif ekspresyonu.....	49
Şekil 4.3	miR-718'in relatif ekspresyonu.....	50
Şekil 4.4	miR-718 ve miR-564 ekspresyon seviyeleri arasındaki farklar.....	54

SEMBOLLER LİSTESİ

P değeri	Olasılık değeri
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	İki üzeri eksi delta delta ct
χ^2 testi	Ki-kare testi
β	Beta
3'	Üç üssü
5'	Beş üssü

KISALTMALAR LİSTESİ

TNM	Tümör-Nodül-Metastaz
miRNA	MikroRNA
miR-564	MikroRNA-564
miR-718	MikroRNA-718
APC	Adenomatozis Polipozis Koli
eoKRK	Erken Orijinli Kolorektal Kanser
CiN	Kromozomal İnstabilite
MSİ	Mikrosatallit İnstabilitesi
nt	Nükleotit
mRNA	Mesajcı RNA
3' UTR	3' Translasyona Uğramayan Bölge
5' UTR	5' Translasyona Uğramayan Bölge
pri-miRNA	Primer MikroRNA
pre-miRNA	Prekürsör MikroRNA
ssRNA	Tek İplikli RNA
RISC	RNA-İndüklenmiş Susturucu Kompleks
qRT-PCR	Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BÖLÜM I

GİRİŞ

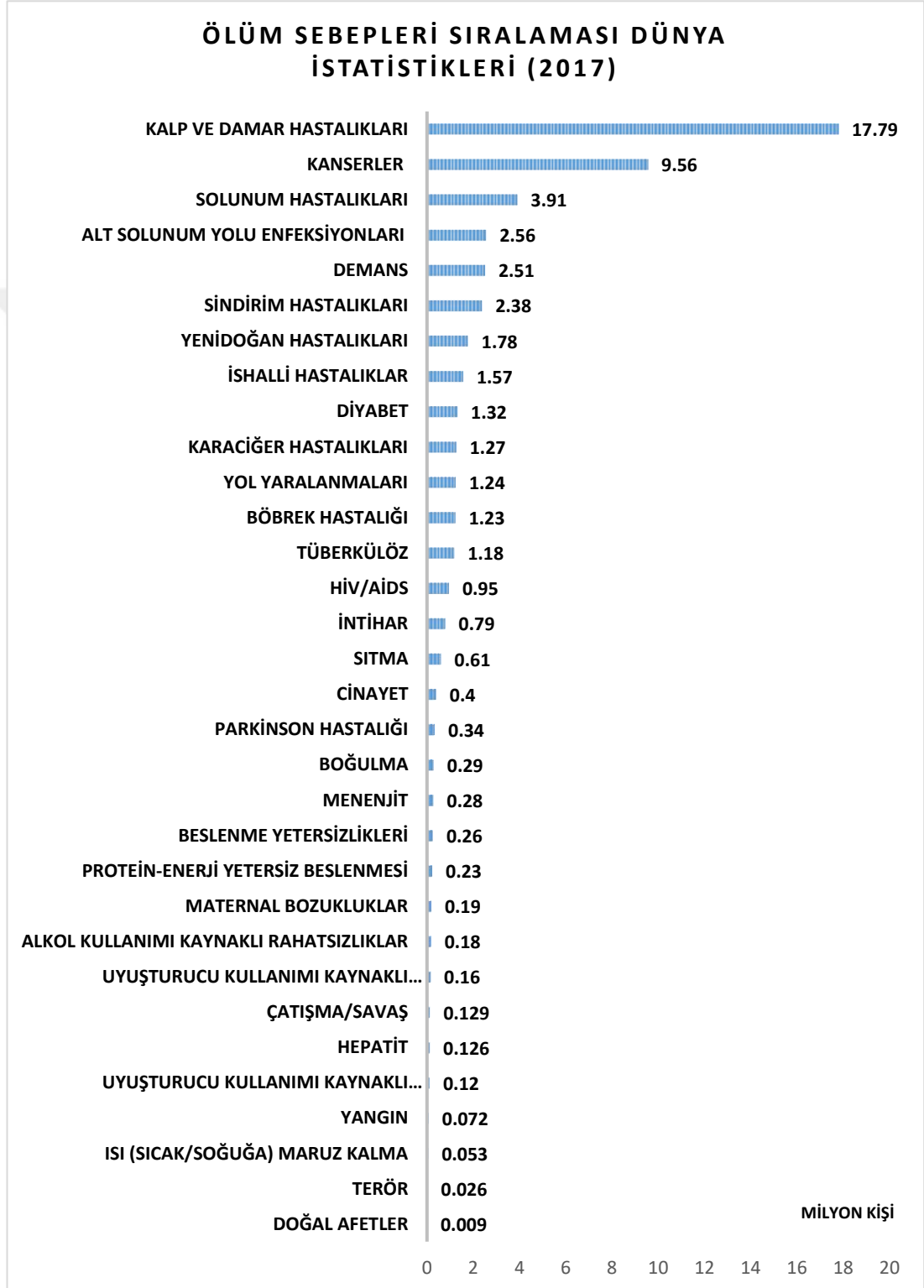
1.1. Kanser

Ulusal Kanser Enstitüsü, kanseri, bölünüp yakındaki dokulara yayılabilen anormal hücrelerin sebep olduğu bir hastalıklar topluluğu olarak tanımlamaktadır. Bu anormal hücreler vücudun birçok bölgesinde ortaya çıkabilir, çok çeşitli kanser türlerine yol açabilir ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilmek için kan ve lenf sistemlerini kullanabilirler (National Cancer Institute, 2021).

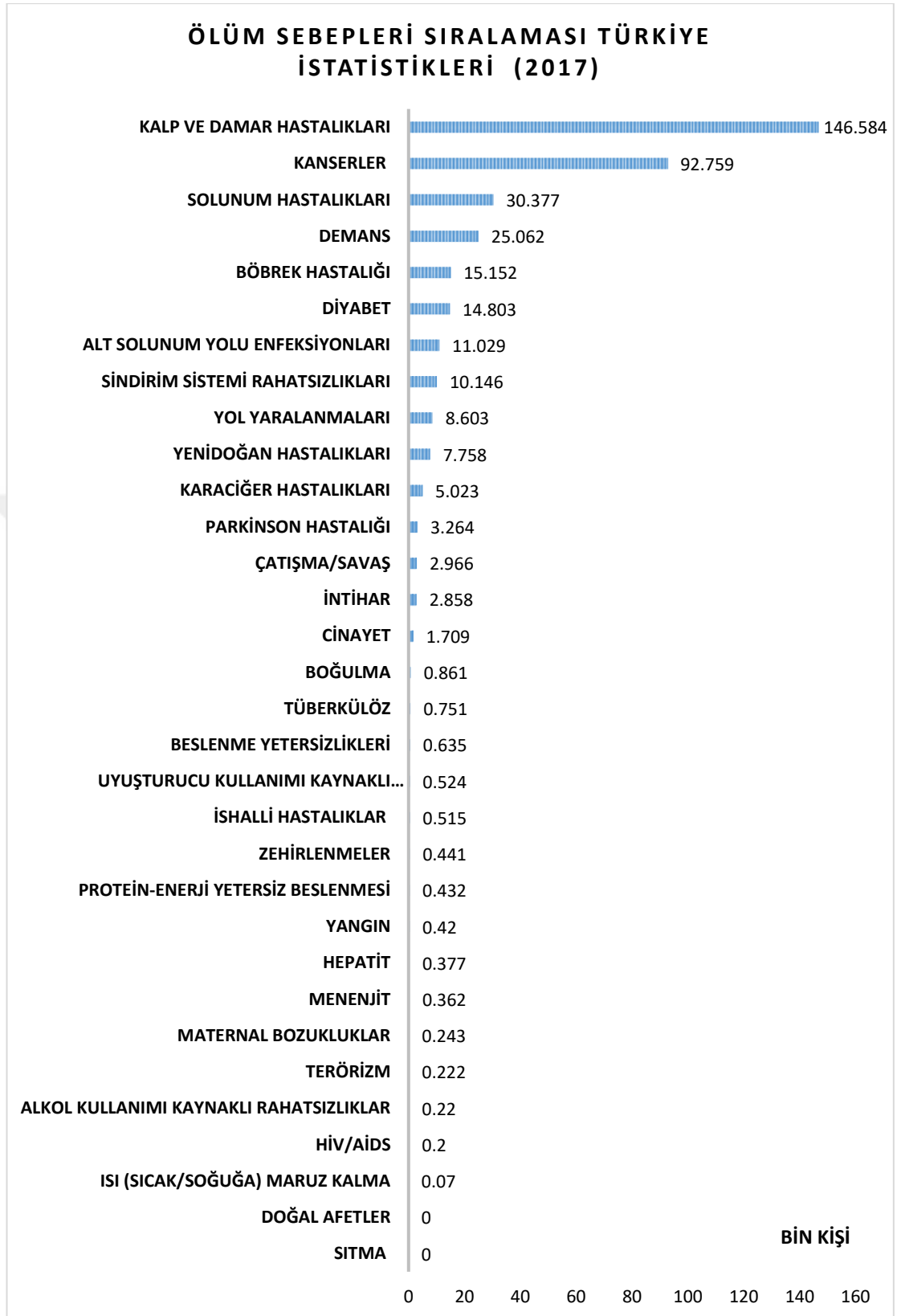
Aslında, “kanser” terimi, bu hastalığın çok fazla formunu kapsamaktadır. Vücuttaki hemen hemen her doku, maligniteler üretebilmektedir; hatta bazı dokular birkaç tür malignite birden üretebilmektedir. Ayrıca her kanserin kendine has özellikleri vardır. Yine de, çeşitli tümörleri üreten temel süreçler oldukça benzer görünmektedir. Normal bir sağlıklı vücudun tüm hücreleri, birbirinin çoğalmasını düzenleyen karmaşık ve birbirine bağlı bir düzen içerisinde. Gerçekten de normal hücreler, yalnızca çevrelerindeki diğer hücreler tarafından aldıkları “sinyaller” neticesinde çoğalırlar. Bu kesintisiz işbirliği, tüm dokuların, vücudun ihtiyaçlarına uygun bir boyut ve mimariyi korumasını sağlamaktadır. Kanser hücreleri, bunun tam tersine, bu bütünlüğü ihlal ederler; çoğalma üzerindeki olağan kontrollere karşı tepkisiz kalırlar ve üreme için kendi iç gündemlerini takip ederler. Ayrıca kanser hücreleri; ortaya çıktıkları bölgeden göç etme, yakındaki dokulara invazyon yeteneği ve vücudun uzak bölgelerinde kitleler oluşturma yeteneği gibi çok daha sinsi birtakım başka özelliklere de sahiptirler. Bu tür malign hücrelerden oluşan tümörler zamanla daha agresif hale gelirler ve organizmanın bir bütün olarak hayatta kalması için gerekli olan doku ve organları bozduklarında ise ölümcül hale gelirler (Weinberg, 1996).

Kanserin 100’den fazla türü vardır. Kanser türleri genellikle kanserlerin oluştuğu organ veya dokulara göre adlandırılmaktadır. Kanserler, epitel hücresi veya skuamöz hücre gibi onları oluşturan hücre tipleriyle de tanımlanabilmektedir (American Cancer Society, 2022).

Kanser, birçok insanın hayatını tehdit etmektedir ve çok ciddi bir hastalıktır. Ülkemizde ve dünya çapında, ölüm nedenleri sıralamasında kardiyovasküler hastalıkların hemen ardından ikinci sırada (Şekil 1.1-1.2) gelmektedir (Ritchie ve Roser, 2018; Globacan, 2020; Sung vd., 2021)



Şekil 1.1 Ölüm sebepleri sıralaması dünya istatistikleri (Ritchie ve Roser, 2018)



Şekil 1.2 Ölüm sebepleri sıralaması Türkiye istatistikleri (Ritchie ve Roser, 2018)

1.2. Kolorektal Kanser

Genel olarak, kolorektal kanser oluşumu normal bir kolorektal epitelin iyi huylu bir adenoma dönüşümü ile başlamakta ve daha sonra çoklu genetik ve epigenetik anormalliklerin kademeli olarak birikmesiyle ilerleyerek, invaziv ve metastatik tümörlere yol açmaktadır. Bu sürecin, hücrelerin çoklu düzenleyici katmanlarından kaçması ve tam olarak gelişmesi (Şekil 1.3) yıllar ile on yıllar alabilmektedir (Nguyen ve Duong, 2018).

1.2.1. Kanser Evreleme, TNM Yöntemi ve Kolorektal Kanserin Gelişimi

Kanser evreleme, kanserin hastanın vücudunda nerede ve ne boyutta olduğunu tespit edilmesi işlemidir.

Kanser evreleme;

- Kanser hastaların vücudunda ne boyutta olduğu
- Hastalara etkisinin ne olduğu
- Hastaların iyileşme olasılıklarının ne olduğu
- Her hasta için hangi tedavinin uygulanacağı
- Kanser çalışmalarında aynı evrelerdeki farklı hastalar için benzerlik ve farklılıkların ortaya konarak kanser için yeni bulgular ve tedaviler ortaya konması

Gibi konuların anlaşılmasını sağladığı için, kanserde çok önemli bir unsurdur (American Cancer Society, 2022).

Belirli kanser türlerinin belirli evreleri, benzer özellikler göstermektedir. Kanser evrelendirmeleri genellikle, tümör oluşturan kanserler için kullanılır. Öte yandan kanserin ve tedavisinin kişisel olduğu unutulmamalıdır. Kanser çeşitli zaman dilimlerinde evrelendirilir. Genellikle kanser tanısı konulduğunda, kanserin hangi evrede olduğu teşhisi de konulur. Her bir evredeki toplam ölüm istatistiklerine göre kişinin ölüm riski de belirlenebilir. Örneğin kolorektal kanser Evre IV'te bulunan hastaların, kanser teşhisi konulduktan sonraki beş yıl içerisinde %40'ı öldü ise, sonraki 5 yılda Evre IV'teki her 100 kişiden 60'ının hayatta kalacağı beklenir. Bu da hastaların durumlarının ne olacağı hakkında, kesin olmasa da genel bir bilgi vermektedir (American Cancer Society, 2022).

Kanser evrelendirme için birçok sistem kullanılmakla birlikte, Amerikan Birleşik Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer) ve Uluslararası Kanser Savaş Örgütü (Union for International Control of Cancer), doktorların kanser teşhisi için ortak bir standart belirlemesi amacı ile TNM kanser evreleme sistemini kullanmaktadır. TNM kanser evrelemesi tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntemdir.

TNM; T: Tumor (tümör), N: Node (nodül), M: Metastasis (Metastaz) kelimelerinin baş harflerinden türetilmiştir.

Tümör evresi: Primer (birincil) tümör yani ilk tümörün gelişimini ifade eder. Tanı koyulurken bu bölgeye bakılır ve kanserin evresi belirlenir.

T'nin yanında bir harf veya bir rakam bulunabilir. Tx, T0, T1, T2, T3, T4 aşamalara ayrılır. Tx, primer tümör oluşumu ile ilgili bir veriye ulaşılamadığını ifade ederken, T0 primer tümörle ilgili bir kanıtın elde edilemediğini gösterir. T1,2,3,4 gibi rakamlarla da primer tümörün derecesi belirtilir. T1'de tümör gelişimi en düşük düzeyde iken T4'de en yüksek düzeydedir.

Nodül evresi: Lenf düğümleri birçok kanserde, kanserli hücrelerin civardaki dokulara yayılmadan önceki ilk durağıdır. N0 kanserli hücrelerin yakındaki lenf düğümlerine sıçramadığını gösterirken, N1-2-3-4 gibi N değerleri yükseldikçe, lenf düğümlerine sıçrayan kanserli hücrelerin sayısının ve bu durumdan etkilenen lenf düğümlerinin boyutunun ve sayısının arttığını gösterir.

Metastaz evresi: Kanserlin uzak dokulara ve organlara yayılıp yayılmadığını ifade eder. M0 primer tümördeki kanserli hücrelerin uzak doku ve organlarda görülmediğini belirtirken, M1 evresi kanserlin vücudun uzak doku ve organlarına yayılmış olduğunu ifade eder.

Her kanser çeşidinin kendine özgü TNM kategorisi vardır. Kimi kanser türlerinde bu kategoriler de kendi içinde, T2a-T2b gibi çeşitlere ayrılabilir. Örneğin kimi kanser tiplerinde T kategorisi tamamen tümörün boyutunu tanımlamak için kullanılırken, başka kanser tiplerinde T kategorisi kanserlin yakın dokulara ne kadar yayıldığını veya bir organın içine ne kadar nüfuz ettiğini belirtmek için kullanılabilir.

Kanser evrelendirme sistemleri; klinik evreleme, patolojik evreleme, tedavi sonrası evreleme, nüksetme veya tekrar tedavi evrelemesi gibi kısımlara ayrılır.

TNM sisteminde bunların hangi evrelendirme sisteminin kullanıldığının anlaşılması için, örneğin; Klinik T1 (kT1), patolojik T1 (pT1) şeklinde, küçük harflerle kategorinin başına yazılarak belirtilmesi gerekir.

Yine aynı şekilde tedavi sonrası evreleme için başına küçük harfle ‘y’ harfi (ycP2), nüksetme veya tekrar tedavi durumu için ise küçük ‘r’ harfi (rcP1) şeklinde yazılması gerekir.

Kanseri evrelere ayırmak için daha başka yöntemler de kullanılır. Bunlar;

Kanser derecesi: Kanser mikroskop altındaki görünüşünün tuhaflığını ifade eder ve genellikle rakamlarla ifade edilir. Grade1-2-3-4 (G1, G2, G3, G4) şeklinde rakamların yükselmesi kanserli hücrelerin daha koyu, belirgin ve anormal görümlü olduğunu gösterir.

Hücre tipi: Bazı kanser türleri değişik tipteki hücrelerle başladığı için, hücre tipi kanser tedavisi ve prognozu için önemli olabilmektedir.

Tümörün lokasyonu: Bazı kanser türlerinde tümörün yerleşim bölgesi kanser prognozunda oldukça önemli olmaktadır.

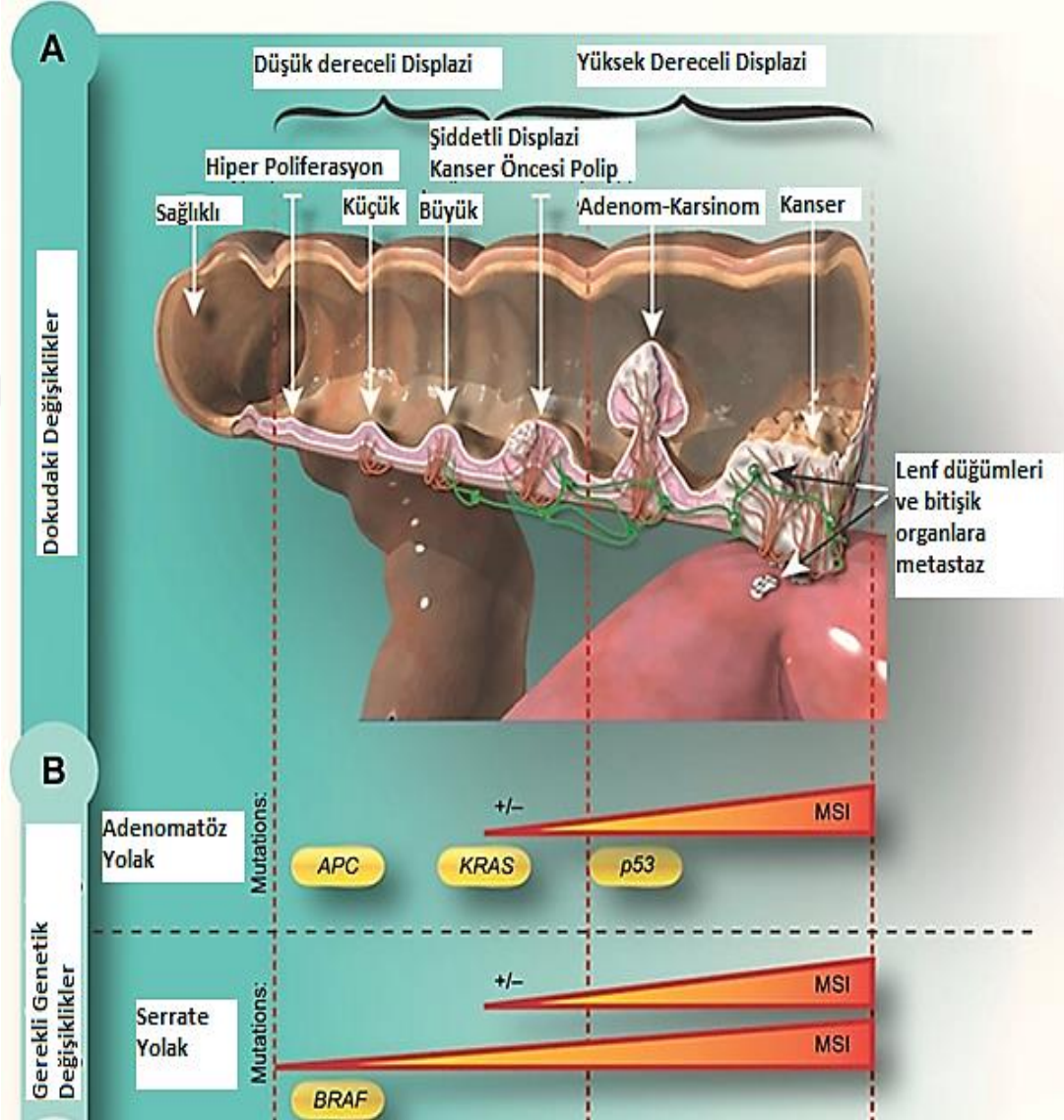
Bazı tümör belirteçlerinin kandaki seviyeleri: Belirli maddelerin kandaki seviyesi kanser prognozunda ve kanserin evrelendirmesinde kullanılır.

Kanser hücrelerinde yapılan testlerin sonuçları: Bazı kanser türlerinde kanser hücreleri üzerinde yapılan laboratuvar testleri, evrelemenin önemli bir parçasıdır.

Bireyin yaşı: Kanser hastasının yaşı kanserde prognozu etkileyebilir. Bu sebeple yine evrelemede yaş faktörü dikkate alınır.

Genel olarak birçok kanserde, evreler roma rakamlarıyla gösterilir ve genellikle I, II, III, IV şeklinde, dört aşamalı olarak gösterilirler. Evre I deki kanserler daha az ilerlemiş, iyi prognoz gösteren ve tedavisi görece daha basit kanserler iken aşama IV de doğru gidildikçe kanserin prognozu ve tedavisi güçleşir.

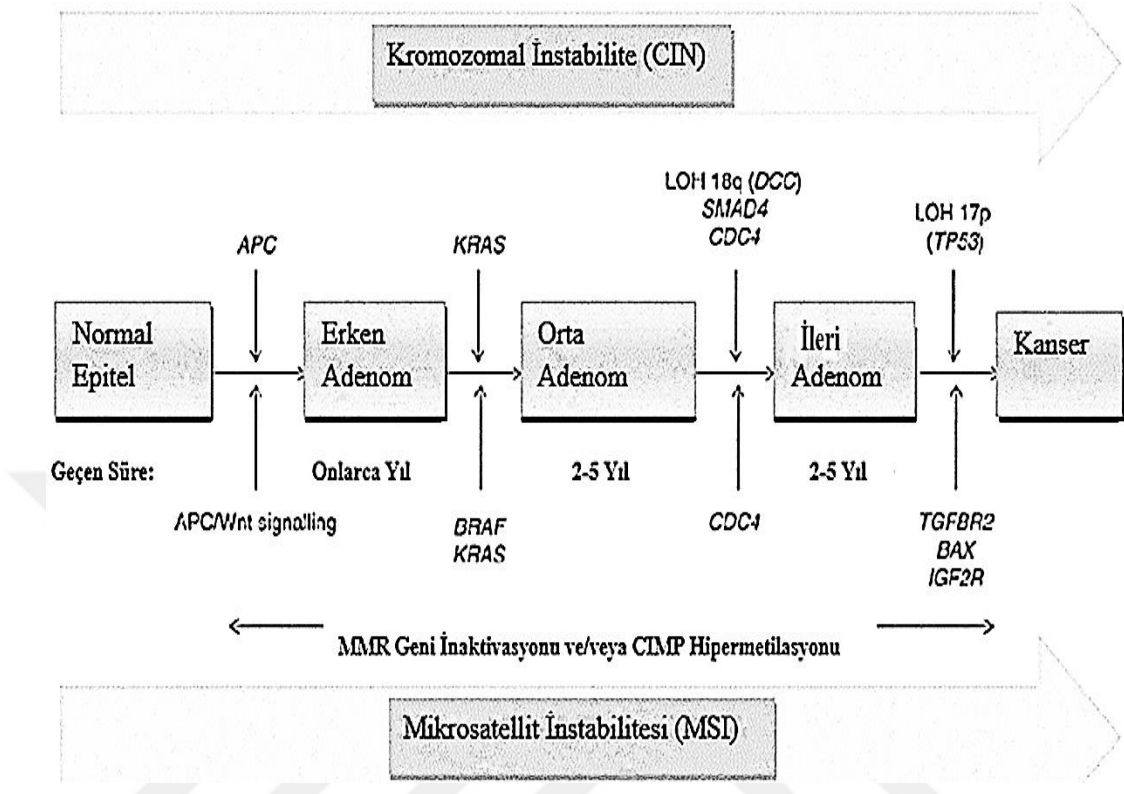
Bunun yanı sıra bazı kanser türleri Evre IA. Evre IB gibi daha alt kategorilere de ayrılabilir (American Cancer Society, 2022).



Şekil 1.3 Kolorektal kanserin gelişimi (Simon, 2016)

Günümüzde Fearon ve Vogelstein tarafından önerilen kolorektal karsinogenezin çok aşamalı genetik modeli (Şekil 1.4) yaygın olarak kabul edilmekte ve katı tümör ilerlemesi için bir örneklem olarak kullanılmaktadır. Bu modele göre, ilk olay olarak APC'nin inaktivasyonu meydana gelir, bunu adenomatöz evrede onkojenik KRAS mutasyonları izler ve nihayetinde maligniteye geçiş sırasında kromozom 18q'nun

silinmesi ve tümör baskılayıcı gen *TP53*'ün kromozom 17p üzerindeki inaktivasyonu meydana gelir (Nguyen ve Duong, 2018).



Şekil 1.4 Kolorektal kanserin genetik modeli (Nguyen ve Duong, 2018)

Kolorektal kanserin bu genetik modelinin birkaç anahtar özelliği vardır:

- (1) Ana tümör baskılayıcı genlerin mutasyonel inaktivasyonu ile birlikte onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu, kolorektal kanserin gelişiminde kritik bir rol oynar.
- (2) Kolorektal kanserin oluşması için en az 4-5 gende mutasyon gereklidir.
- (3) Genetik mutasyonların öncelik sıralarının aksine toplam birikimleri daha kritik olaydır.
- (4) Mutant tümör baskılayıcı genler, heterozigot durumunda mevcut olduklarında bile biyolojik bir etki gösterirler (Saif ve Chu, 2010).

2.2. Kolorektal Kanserın Epidemiyolojisi

Kolorektal kanser 2020 yılında dünya çapında, 1,9 milyon vaka ile, tüm kanser türleri arasında, insidansta üçüncü sırada ve 935.000 ölüm ile mortalitede ikinci sırada yer

almaktadır. Bu da kolorektal kanseri, yaklaşık olarak her 10 kanser vakasından ve ölümden birinin sorumlusu yapmaktadır (Tablo 1.1) (Globacan, 2020).

Tablo 1.1 2020 yılı insidansı ve mortalitesi en yüksek olan ilk 10 kanser türündeki yeni vakalar ve ölümler

KANSER BÖLGESİ	YENİ VAKA SAYISI	TÜM BÖLGELERE GÖRE ORANI %	YENİ ÖLÜM SAYISI	TÜM BÖLGELERE GÖRE ORANI %
MEME KANSERİ	2,261,419	(11.7)	684,996	(6.9)
AKCİĞER	2,206,771	(11.4)	1,796,144	(18.0)
PROSTAT	1,414,259	(7.3)	375,304	(3.8)
MELANOM OLMAYAN CİLT KANSERİ	1,198,073	(6.2)	63,731	(0.6)
KOLON	1,148,515	(6.0)	576,858	(5.8)
MİDE	1,089,103	(5.6)	768,793	(7.7)
KARACİĞER	905,677	(4.7)	830,180	(8.3)
REKTUM	732,210	(3.8)	339,022	(3.4)
RAHİM AĞZI	604,127	(3.1)	341,831	(3.4)

ÖZOFAGUS (YEMEK BORUSU)	604,100	(3.1)	544,076	(5.5)
ANÜS	50,865	(0.3)	19,293	(0.2)

Kolorektal kanser kadınlarda, toplam vakaların %10'u ile en sık teşhis edilen kanser olan meme kanseri (toplam vakaların %11,7'si) ve bunu izleyen 2. sıradaki akciğer (%11,4), kanserlerinin ardından 3. sırada gelmektedir. Mortalite açısından ise kadınlarda akciğer kanserinin ardından 2. sırada gelmektedir. Erkeklerde kolorektal kanser insidans açısından, akciğer ve prostat kanserinden sonra 3. sırada gelirken, mortalite açısından akciğer ve karaciğer kanserlerinin ardından 3. sırada gelmektedir (Globacan, 2020; Sung vd., 2021).

Epidemiyolojik çalışmalar kolorektal kanser (erken orijinli kolorektal kanser (eoKRR)) insidansının 50 yaşın altındaki kişilerde çarpıcı biçimde giderek artacağını göstermektedir (Thanikachalam ve Khan, 2019; Venugopal ve Carethers, 2022).

1.2.3. Kolorektal Kanser Genomik İnstabilitesi

Genomik instabilite, nokta mutasyonlarından kromozomal yeniden düzenlemeye kadar çeşitli genetik veya genomik değişiklikleri barındırır. Genomik instabiliteye kolorektal kanserde sıkça rastlanmaktadır ve kolorektal kanserde, kromozomal instabilite (CİN) ve mikrosatellit instabilitesi (MSİ) olarak 2 farklı yolak ile kendini göstermektedir. CİN, kolorektal kanserin yaklaşık %85'inde bulunurken, kolorektal kanserin kalan %15'inde MSİ'ye rastlanır (Hong, 2018).

1.2.3.1. Kromozomal İnstabilite (CİN)

Normal insan hücrelerinde ortalama genomik mutasyon oranının $\sim 2.5 \times 10^{-8}$ mutasyon/nükleotit/jenerasyon olduğu tahmin edilse de ardışık hücre bölünmeleri sırasında çoklu mutasyonların birikmesi, kanser hücrelerinde bu oranı yükseltmektedir. Buna göre, MMR (Yanlış eşleşme tamiri) genlerindeki mutasyonlar, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen genler ve/veya hücre sel yanıtlar, mutasyon oranlarını insan tümörlerinde yaygın olarak gözlenen düzeye

yükseltebilmektedir. Bu mutasyonlu fenotipler; nokta mutasyonları, CİN, MSI, CİMP (cgp adası mutator protein) ve LOH (Heterozigotluk kaybı) dahil olmak üzere çeşitli şekillerde ortaya çıkabilirler. CİN, adenom-karsinom geçişlerinin %85'inde gözlenen, kolorektal kanserdeki en yaygın genetik instabilite tipi gibi görünmektedir. CİN, kromozomların tamamında veya büyük kısımlarında meydana gelen yüksek orandaki kayıplara veya eklenmelere karşılık gelmektedir. Bu da hücreler arasında karyotipik değişkenliğe yol açmaktadır. Sonuç olarak CİN, sub-karyotipik amplifikasyon, anöploidi, kromozomal yeniden düzenleme ve tümör baskılayıcı gen lokuslarında yüksek heterozigozite kaybı (LOH) frekansının oluşmasına yol açmaktadır. Ek olarak, CİN tümörleri, *KRAS* proto-onkogen GTPaz (*KRAS*), *B-Raf* proto-onkogen serin/treonin kinaz (*BRAF*), *APC* ve tümör protein *p53* gibi, tümör baskılayıcı genler dahil olmak üzere spesifik onkogenlerdeki mutasyonların birikmesiyle kendini gösterir ve kolorektal kanserde tümör oluşumuna katkıda bulunur (Nguyen ve Duong, 2018).

Belirli tümörlerde tüm kromozom kollarının alelik kaybı saptanmış olsa da frekansları önemli ölçüde değişmektedir ve kromozom kolları 1p, 5q, 8p, 17p, 18p, 18q, 20p ve 22q kayıpları da dahil olmak üzere, kolorektal kanserde bunlardan sadece birkaçı yüksek oranda tekrar etmektedir. Spesifik bir kromozomal bölgedeki yüksek frekanslı alelik kayıp, kromozom 5q üzerinde *APC*, kromozom 17p üzerinde *TP53* ve kromozom 18q üzerinde, *DCC* netrin 1 reseptörü (*DCC*), *SMAD* ailesi elemanları (*SMAD2* ve *SMAD4*) dahil olmak üzere bir tümör baskılayıcı gen adayının varlığına işaret etmektedir. Buna karşılık, kromozomal materyal kazanımı, hücre büyümesini veya hayatta kalmasını destekleyebilecek potansiyel onkogenlerin veya genlerin varlığını akla getirmektedir. Bununla birlikte, kromozomal materyallerin eklenmesi/eksilmesi genellikle geniş bir bölgeyi kapsar ve çok sayıda gen içerir, bu da hedef genlerin tanımlanmasını zorlaştırır (Nguyen ve Duong, 2018).

1.2.3.2. Mikrosatellit İnstabilitesi (MSİ)

Mikrosatellit instabilitesi (MSİ), DNA yanlış eşleşme tamiri sistemindeki bir bozukluktan (dMMR) kaynaklanır. Mikrosatellitler hem kodlayan hem de kodlamayan dizilerde bulunur ve dMMR/MSI tümörleri yüksek mutasyon birikimi ile ilişkilidir. Bu mutasyonların bazıları kodlama dizilerinde meydana gelir ve bir anti-tümöral bağışıklık tepkisini tetikleyebilen neo-antijenlerin üretimine yol açar.

Bu da metastatik olmayan MSI tümörlerinin neden yüksek immün infiltratlar olduğunu ve iyi prognoz ile ilişkilerini açıklamaktadır. Metastatik MSI tümörleri, tümörün bağışıklık sisteminden kaçmasından kaynaklanır ve kötü prognoz ve kemorezistans ile ilişkilidir (Randirian vd., 2021).

Mikrosatellit instabilitesi (MSI) aynı zamanda kalıtsal bir kanser yatkınlığı olan Lynch sendromunun (LS) bir göstergesi ve immünoterapiye yanıtı öngören bir prognostik belirteçtir. Frekansına göre 3 tip MSI vardır. Bunlar: yüksek mikrosatellit instabilitesi (MSI-H), düşük mikrosatellit instabilitesi (MSI-L) ve mikrosatellit stabilitesidir (MSS). Kolorektal kanserlerin yaklaşık %12 ila %20'si DNA yanlış eşleşme tamirine bağlı olarak MSI-H ile açıklanır (Tieng vd., 2021).

1.2.4. Kolorektal Kanser Moleküler Yolakları

APC/ β -Katenin

Adenomatöz polipozis koli (APC)/ β -katenin sinyal yolunun arızalanması, sporadik kolorektal kanserde erken evrede gelişen yaygın bir olaydır (Phelps vd., 2009).

APC geninin inaktivasyonu ve bunun sonucunda Wnt yolunun yapısal aktivasyonu, hücre proliferasyonunu, göçünü, apoptozu ve muhtemelen bağırsak kök hücre farklılaşmasını etkileyerek güçlü bir seçici avantaj sağlamakta ve daha sonra, diğer sinerjistik mutasyon olayları, mutant APC'nin CIN'i (kromozomal instabilite) indüklemesine ve adenom-karsinom dizisi boyunca tümör ilerlemesini hızlandırmasına yol açabilmektedir (R. Fodde, 2002).

TP 53

17p13.1 kromozomunda yer alan tümör baskılayıcı TP53 geni, "genomun koruyucusu" veya "büyüme ve bölünmenin hücresel bekçisi" olarak bilinmektedir. Bu genin ürünü 393 amino asit uzunluğunda bir fosfoprotein olan p53'tür. Bu protein hücresel büyüme kontrolünün anahtar düzenleyicisi olarak görev yapar ve DNA hasarını takiben hücre döngüsünün durması ve apoptozda önemli olan genlerin uyarılmasında merkezi bir rol oynar. TP53, insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir. En yaygın mutasyonlar, protein fonksiyonunu değiştiren nokta mutasyonlarıdır. Bu gen, kanserlerde sıklıkla mutasyona uğramasının yanı sıra yüksek oranda polimorfiktir. Kolorektal kanserde, TP53'te bildirilen mutasyon

sıklığı %50'dir. İlginç bir şekilde, *TP53*'ün korunmuş bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar, proksimal kolona kıyasla distal yerleşimli tümörlerde daha sıktır ve bunun, kolorektal kanser etiyolojisindeki farklılıkları yansıttığı öne sürülmüştür (Naccarati vd., 2012).

RAS Onkogenleri-KRAS

RAS onkogeni, hücre büyümesi ve düzenlenmesinde iyi anlaşılmış bir role sahiptir ve bu genin protein ürünü, hücre proliferasyonu, apoptoz, göç, hücre kaderinin belirlenmesi ve farklılaşma dahil olmak üzere birçok hücresel işlevi etkilemektedir. Bu genin insanda bilinen üç izoformu vardır; *NRAS*, *HRAS* ve *KRAS*. Kolorektal kanserlerin %30-50'si mutasyona uğramış *RAS* genleri içermektedir (Bell vd., 1993; Roock vd., 2007).

RAS, guanin nükleotidlerini bağlayan ve intrinsik GTPaz aktivitesine sahip olan 21 kD zara bağlı proteinlerin bir sınıfını kodlayan gen ailesine verilen isimdir. Tüm insan kanserlerinde en yüksek sıklıkla meydana gelen mutasyonlar *KRAS*'taki mutasyonlardır (%21.6). Bunu *NRAS* (%8.0) ve *HRAS* (%3.3) mutasyonları takip etmektedir. (Bamford vd., 2004).

Tüm *KRAS* mutasyonlarının yaklaşık %97'si kodon 12 veya 13'te lokalizedir. Kodon 12'deki nokta mutasyonları kolorektal kanserde en yaygın görülen *KRAS* mutasyonudur (Arrington, 2012).

DCC

İnsan genom dizisi verilerinin analizi, *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer)'nin gerçekten de yaklaşık 1,2 milyon baz çiftini (Mb) kapsayan muazzam bir gen olduğunu göstermiştir. *DCC* geni, alternatif splicing'in bir sonucu olarak birkaç farklı protein ürününü kodlamaktadır. Bununla birlikte bilinen tüm izoformları, tip I transmembran glikoproteinleri gibi görünmektedir (Mehlen ve Fearon, 2004).

DCC geni, 18. kromozomun (18q) uzun kolunda bulunur. *DCC*'nin bir alleli, kolorektal tümörlerin %71'inde kaybolur ve ekspresyonu, kolon kanseri hücre hatlarının %88'inde ya belirgin şekilde azalır ya da hiç görülmez. *DCC* proteini çoğu dokuda, özellikle beyinde ve normal kolon mukozasında eksprese edilir. Sporadik

kolorektal kanserlerde *DCC*, bir tümörün metastaz yapma kabiliyetini içeren kritik bir rol oynuyor gibi görünmektedir (Carethers, 1996).

SMAD AİLESİ

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (*TGF β*) süper ailesi, nematod solucanları, sinekler, fareler ve insanlar dahil olmak üzere çeşitli organizmalardaki hücrelerin büyümesini, gelişmesini ve farklılaşmasını düzenlemektedir. *TGF β* süper ailesi üyeleri hücre yüzeyi serin/treonin kinaz reseptörlerine bağlandıktan sonra, sinyaller başlatılır ve daha sonra Smads olarak bilinen hücre içi araçlar tarafından bu sinyaller yayılır. Smad'lerin aktivasyonunun ardından, sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonları gerçekleşir. Burada hedef gen ekspresyonunu düzenlemek için transkripsiyon faktörleri ile birlikte transkripsiyonu aktive eder veya baskırlar. Farelerde *SMAD* genlerinin kasıtlı bozulması, bunların embriyonik gelişimdeki önemini ortaya çıkarmış ve insan kanserlerinde *SMAD* 'ların tümör baskılayıcı rolü tanımlanmıştır. Bu nedenle *SMAD* 'lar, gelişim ve hastalıkta *TGF β* -süper ailesi sinyallerine aracılık etmede önemli bir rol oynamaktadırlar (Attisano ve Hoeflich, 2001).

SMAD ailesi üyesi 4 (*SMAD4*) 18q21 bandında lokalizedir. Transmembran reseptör protein serin-treonin kinaz tarafından fosforile edilir ve aktive olur. Ayrıca *TGF- β* yolunun anahtar araçlarından biridir. Protein, bir tümör baskılayıcı görevi görür ve epitelyal hücre proliferasyonunu inhibe eder. *SMAD4*'ün kaybı, kolorektal kanser hastalarında kötü prognoz ve 5-florourasil (5-FU) direnci ile ilişkilidir. Sporadik *SMAD4* mutasyonu, kolorektal kanserlerin %2.1–20.0'ında rapor edilmiştir. Primer tümörün genetik değişikliklerinin metastatik tümörünkilerle karşılaştırılmasında, *SMAD4* mutasyonu, metastatik kolorektal kanserde en sık görülen genetik değişikliklerden biridir ve *SMAD4*'ün kolorektal kanserde, klonal evrimde rol oynadığını düşündürmektedir (Oyanagi, 2019).

MAPK, PI3K, BRAF

MAPK ve *PI3K* yolaklarının her ikisi de hücre proliferasyonu ve hayatta kalmasında rol oynarlar. Bu nedenle, bu yolakları etkileyen değişiklikler tümör hücreleri üzerinde proliferatif avantajlar sağlamaktadır. *KRAS*, *BRAF* ve *PI3K* mutasyonları, kolorektal

kanserde en sık görülen mutasyonlardır. Buna ek olarak, *BRAF* mutasyonları, özellikle mikrosatellit instabilitesi olan tümörlerde daha düşük sağkalım oranları ile ilişkilidir ve kötü bir prognoza sahiptir. Birçok kanser türünde en yaygın *BRAF* mutasyonu olan *BRAF* V600E, metastatik kanserde kötü bir prognostik faktör olmasına rağmen, kişiselleştirilmiş tıp için umut verici bir hedeftir ve spesifik *BRAF* V600E inhibitörlerinin diğer MAPK/PI3K yolu inhibitörleriyle kombinasyonunun metastatik kolorektal kanser tedavisinde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Mármol vd., 2017).

1.2.5. Kolorektal Kanser Etiyolojisi

Diyet ve yaşam tarzı faktörleri ile kolorektal kanserin altında yatan potansiyel mekanizmalar arasındaki bağlantıya dair yapılan çalışmalardan elde edilen birçok kanıt mevcuttur. Bu faktörler arasında;

Alkol

Alkol alımı, kolorektal kanser gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biridir. Orta düzeyde alkol kullanımının dahi kolorektal kanser riskini artırdığını gösteren epidemiyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Alkol metabolizması, etanolün kolonda kanserojen etkiler gösterebilen metabolitlere dönüşümünü içermektedir. Asetaldehit ve alkolün diğer metabolitlerinin oluşumu, DNA katım formasyonu, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, epigenetik değişiklikler, epitelyal bariyer disfonksiyonu ve immün modülatör etkiler gibi kanseri teşvik eden kaskadların aktivasyonuna yol açmaktadır. Alkol, toksik etkisini kanserojen metabolitler yoluyla indüklemekle kalmaz, aynı zamanda alkoliklerin kendileri de alkolün neden olduğu kolon karsinogenezini daha da artırabilen zayıf bir diyetle, düşük folat ve lif alımı ve sirkadiyen bozulmaya yatkındırlar (Rossi vd., 2018).

Kırmızı ve işlenmiş etler

Kırmızı ve işlenmiş etlerin kolorektal kanserle ilişkisini açıklamak için birkaç olası biyolojik mekanizma öne sürülmüştür. Bunlardan birisi, yüksek sıcaklıkta pişirilen etlerde bulunan heterosiklik aminlerin potansiyel mutajenik etkisidir, ancak heterosiklik aminler kümes hayvanlarının etinde de oluştuğu için bu, sadece kırmızı

ve işlenmiş etlere özgü bir şey değildir. İkinci bir mekanizma olarak, çoğu kanserojen olan N-nitroso bileşiklerinin gastrointestinal kanalda endojen oluşurması karşımıza çıkmaktadır. Kırmızı et alımı, insanlarda nitrozo bileşiklerinin endojen oluşumu ile bir doz-yanıt ilişkisi göstermektedir ve bu beyaz ette görülmemektedir. Bu durumun sebebi olarak, kırmızı ette kolayca nitrozile olabilen ve nitrozlama ajanı olarak hareket edebilen bol miktarda “hem” varlığı gösterilmektedir. Koruma için ete eklenen nitritler veya nitratlar, nitrozaminlere, N-nitrozo bileşiklerine ve bunların öncüllerine maruziyeti artırabilmektedir (Chan vd., 2011).

Lifli gıdalar

Diyetteki liflerin kolorektal kanserin önlenmesine yönelik faydalı özelliklerinin altında yatan potansiyel mekanizmalar, dışkı maddesinin kıvamında bir artış, geçiş süresinin azaltılması ve sonuç olarak potansiyel toksik karsinojenler ile kolonik epitelyum arasındaki temas süresinin azaltılmasını içerir. Lifler ayrıca sekonder safra asitleri de dahil olmak üzere sindirimin zararlı yan ürünlerini bağlayabilmektedirler (Aune vd., 2011).

Süt ürünleri, kalsiyum ve D vitamini

Yüksek süt ürünleri tüketiminin kolorektal kanser ile ters ilişki gösterdiği ve bunun sebebinin özellikle kalsiyum olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumun kolon ortamındaki serbest yağ asitleri ve safra asitleri gibi bileşikleri bağlayarak kanserojen potansiyellerini sınırlayabildiği düşünülmektedir, ancak aynı zamanda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği, farklılaşmayı ve apoptozu indüklediği ve DNA hasarını baskıladığı da gösterilmiştir (Thorning vd., 2016). Genellikle kalsiyumla ilişkili bir besin D vitamini. Dolaşımdaki 25-hidroksivitamin D seviyeleri ile kolorektal kanser riskinin azalması arasında güçlü bir ters risk ilişkisi olduğuna dair, özellikle prospektif kohort çalışmalarından elde edilen sağlam epidemiyolojik kanıtlar vardır (McCullough vd., 2019).

Sigara kullanımı

Sigara içmek kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi için yerleşik bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Sigara içmenin, tırtıklı poliplerin veya mikrosatellit instabilitesi olan tümörlerin gelişimi üzerinde diğer moleküler kolorektal kanser alt

tiplerine kıyasla daha güçlü bir etkiye sahip olabileceği ve aspirinin önleyici etkisini azaltabileceği gösterilmiştir (Murphy vd., 2019).

Aşırı kilo, obezite ve fiziksel hareketsizlik

Aşırı kilo ve obezite benzer şekilde kolorektal kanserin yerleşik nedenleri olarak kabul edilmektedir. Yaklaşık 100.000 kolorektal kanser vakasını içeren epidemiyolojik çalışmaların büyük bir meta-analizinden elde edilen veriler, erkeklerde kadınlardan daha güçlü ilişkiler gözlemlenen ve kolon için rektum kanserlerine kıyasla vücut kütle indeksindeki her 5 birimlik artış için genel kanser riskinde %18'lik bir artış gösterilmiştir (Ning vd., 2010). Erkekler ve kadınlar arasında kolorektal kanserin değişken etiyolojisi üzerine daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır. Fiziksel aktivite, yetişkinler için kilo almayı başlıca önleyici faktördür. Aşırı kilo ve obezitenin aksine fiziksel aktivite, kolorektal kanser riski ve teşhis sonrası ölüm riskinin düşüklüğü ile ilişkilidir. Kolorektal kanserin obezite ile gözlemlenen güçlü ilişkilerine rağmen, altta yatan biyolojik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır ve yoğun bir çalışma altındadır. Obezite ayrıca kronik inflamasyon ile ilişkilidir ve adipoz doku kaynaklı inflamatuvar faktörleri ile TNF, leptin, IL-1beta ve IL6 gibi adipokinleri arttırdığı gösterilmiştir. Bu bileşikler oksidatif stresi, bağışıklık sisteminin baskılanmasını, anormal hücre sinyalleşmesini, artan hücre büyümesini ve anjiyogenezi teşvik etmektedir. Obezite ile ilgili diğer potansiyel mekanizmalar, bağırsak mikrobiyomunun çeşitliliğinin azalması, bağırsak mukozal bariyerinin kolonik ortamdan proinflamatuvar ve toksik bileşiklere karşı geçirgenliğinin artması ve bağırsak kaynaklı bağışıklığın değişmesidir (Murphy vd., 2019).

Enfeksiyöz ajanlar ve mikrobiyom

Kolon, hayati metabolik işlevleri yerine getiren büyük ve çeşitli bir mikroorganizma popülasyonuna ev sahipliği yapmaktadır. Bağırsak bakterileri diyet lifinin fermentasyonundan sorumludur ve lif içeren gıdaların koruyucu etkisinin kısmen bütirat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin bakteriyel üretimi ile ilişkili olduğu varsayılmaktadır. *Fusobacterium nucleatum* gibi bazı spesifik bakteriler birkaç çalışmada kolorektal kanser ile ilişkilendirilmiştir (Murphy vd., 2019).

Yaşam tarzı ve beslenme kalıpları

Bazı insanların kolorektal kansere daha yatkın bir vücuda sahip olmasında, *MLH1* germ hattı ve *APC* mutasyonları gibi genetik faktörlerin etiyolojik rolü bulunmaktadır. Kolorektal kanserde bireysel riske genetik faktörlerin katkısı yadsınamaz olsa da kolorektal kanser insidansına, değiştirilebilir diyet alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi faktörlerin etkisi oldukça yüksektir (Keum ve Giovannucci, 2019).

Kolorektal kanser insidansının düşük olduğu ülkelerden, yüksek olduğu ülkelere doğru olan insan göçlerine bakıldığında, göçmenlerin oldukça yüksek hızda kolorektal kanser insidanslarının yükselmesi, bu görüşü destekler niteliktedir (Mousavi vd., 2011).

Genel olarak Akdeniz diyetinin azalan kolorektal kanser riski ile ilişkili olduğu düşünülürken, batı tarzı beslenme alışkanlıklarının ise kolorektal kanser açısından risk teşkil ettiği düşünülmektedir. Fakat bu Akdeniz diyetinin kesin tanımı ve buna şarabın dahil edilip edilemeyeceği gibi konularda net bir sonuca varılamamıştır.

Son birkaç on yılda kolorektal kanser insidansı ve mortalitesi azalmış olsa da epidemiyolojik çalışmalar kolorektal kanser insidansının 50 yaşın altındaki kişilerde artacağını, kişinin diyet miktarı, beslenme durumu, fiziksel aktivitesi ve diğer değişikliklerin kolorektal kanser patogenezi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yüksek miktarda lifli gıda tüketiminin kolorektal karsinom gelişimine karşı koruyucu olabileceği ile ilgili ilk bulgulardan sonra, birçok çalışma kolorektal kanserin patogenezinde bağırsak mikrobiyotasının rolüne odaklanmıştır (Thanikachalam ve Khan, 2019).

İkizler üzerinde yapılan önemli bir çalışma, kalıtsal faktörlerin kolorektal kanser vakalarının %35'inden sorumlu olduğunu, paylaşılan çevresel faktörlerin %5'ini ve paylaşılmayan çevresel faktörlerin kalan %60'ını oluşturduğunu göstermiştir (Lichtenstein vd., 2000).

Son olarak, tanı yaşı da risk derecesini etkilemektedir. Doksan yaşından sonraki kolon kanseri teşhisi, birinci derece akrabalar için 1,5 kat artmış risk ile ilişkilendirilirken, 45 yaşından küçük bir yaşta konulan teşhis için risk 4 kat veya daha fazladır (Burt, 2007).

1.3. Mikro Rna (miRNA)'lar

miRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen, uzunlukları 19-25 nükleotit (nt) olan, küçük, kodlamayan endojen RNA'lardır. miRNA'lar, mRNA üzerindeki hedef bölgeyle baz eşleşmesi yaparak RNA'nın susturulması ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi olaylarda görev alırlar. Bu küçük düzenleyici moleküller, post-transkripsiyonel seviyede protein ekspresyonunu kontrol ederler ve hücre için kritik olan, hücre bölünmesi, çoğalması, farklılaşması, hücre apoptozu ve kan damarlarının oluşumu gibi birçok metabolik yolun yönetiminde etkindirler. miRNA'ları kodlayan genler, kodlama yapmayan genler (noncoding RNAs) olarak karakterize edilirler. İntergenik bölgede; protein kodlayan genlerin intron veya ekzonlarında bulunurlar ancak intragenik bölgede de bulunabilirler. İnsan genomu yaklaşık olarak 2600 olgun miRNA içermekte ve tek bir miRNA çok sayıda genin ekspresyonunu düzenleyebilmektedir (Plotnikova vd., 2019).

1.3.1. miRNA'ların Keşfi

miRNA'ları keşfetmeye yönelik ilk kanıt Lee ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptıkları çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada *C. elegans*'ta lin-4 olarak tanımlanan miRNA bulunmuş ve lin-4'ün hücre farklılaşmasının temporal ilerlemesini kontrol etmede rol aldığını gösterilmiştir (Lee vd., 1993).

Yuvarlak solucan *Caenorhabditis elegans*'ın genetik taramasında incelenen lin-4, bir proteini değil, bunun yerine 22 nükleotidlik küçük bir RNA'yı kodlamaktaydı. 2000 yılında *C. elegans*'ta, gelişimsel zamanlamanın koordine edilmesinde rol oynayan bir başka 22 nükleotidlik miRNA olan, let-7 keşfedilmiştir. Let-7'nin insanlar da dahil olmak üzere türler arasında korunduğunun bulunması, önemli bir biyolojik işlevinin olduğunu düşündürmüştür. Daha sonra, hemen hemen tüm çok hücreli organizmalarda lin-4 ve let-7'ye benzer birçok küçük düzenleyici RNA tanımlandı ve miRNA'lar olarak adlandırıldı (Sylvia vd., 2009).

miRNA ailesinin kurucu üyeleri olan lin-4 ve let-7'nin keşfinden bu yana moleküler klonlama ve biyoinformatik yaklaşımlarla bitkilerde, hayvanlarda ve virüslerde yüzlerce miRNA tanımlanmıştır. miRNA'ların, hedef mesajcı RNA'ların (mRNA'lar) 3' translasyona uğramayan bölgesi (3' UTR) ile baz eşleşmesi yaparak gen ekspresyonunu aşağı regüle ettiği ortaya çıkarılmıştır. Bu keşifler, bu

kodlamayan RNA molekülleri sınıfının, birçok organizmada gen ekspresyon programları üzerinde yeni bir düzenleyici kontrol katmanı oluşturabileceğini göstermiştir (Bushati ve Cohen, 2007).

1.3.2. miRNA'ların Yapısı ve Görevleri

Çoğu miRNA, DNA dizilerinden primer miRNA'lara (pri-miRNA'lar) transkribe edilir ve daha sonra prekürsör miRNA'ları (pre-miRNA'lar) ve işlevsel miRNA'ları oluşturmak üzere işlenirler. Çoğu durumda miRNA'lar, ekspresyonu baskılamak için hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girmektedir (O'Brien vd., 2018).

mRNA'lar genellikle 3' translasyona uğramayan bölgelerinde (3'UTR) miRNA'ların bağlanacağı hedef bölgeyi içerirler. Dolayısı ile miRNA'ların 5' ucu hedefi tanımlama kritik öneme sahiptir. miRNA'nın bu bölgesi, yüksek oranda korunur ve miRNA'nın çekirdeği olarak adlandırılır (Cai vd., 2009).

miRNA'lar belirli bir mRNA substratı yerine bir dizi mRNA'yı hedefleme ve düzenleme eğilimindedir (Cai vd., 2009).

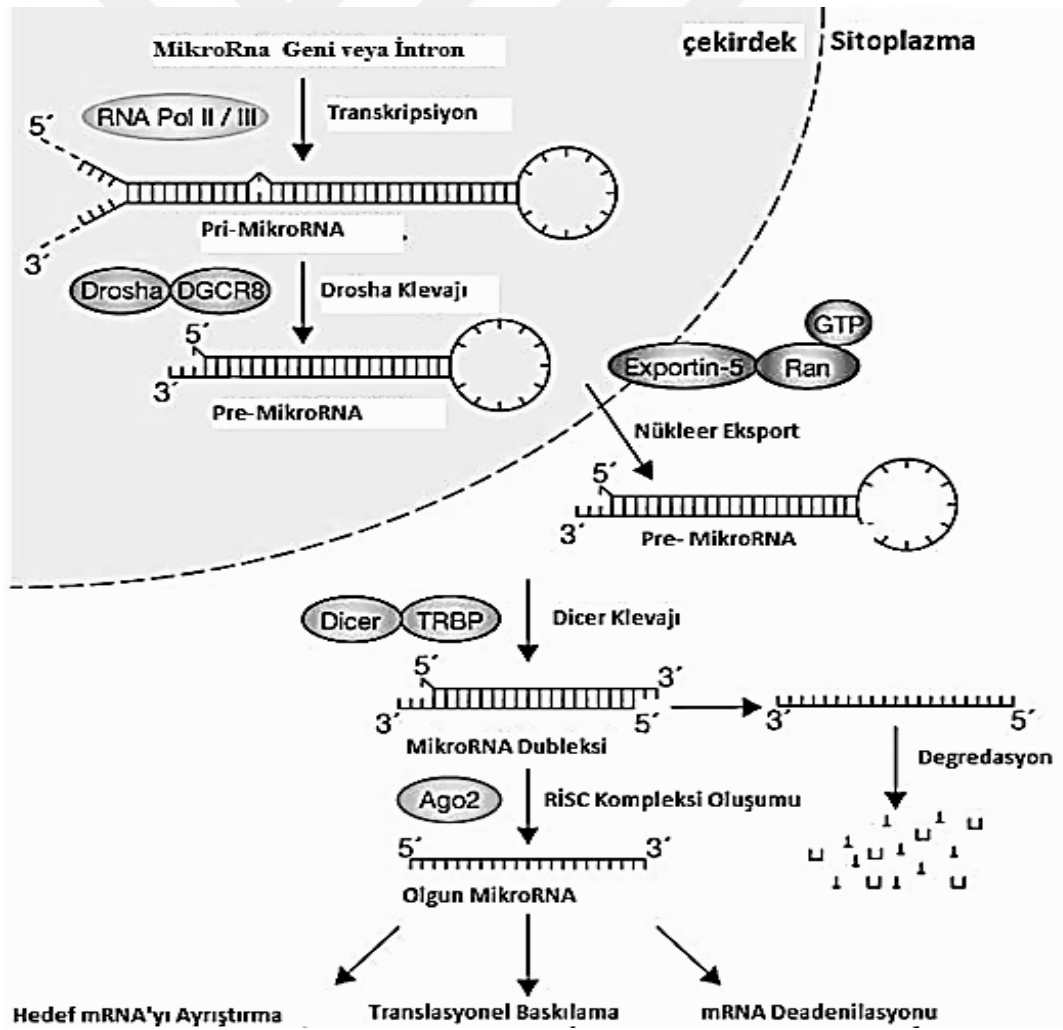
miRNA'ların ekspresyonları genellikle sıkı bir denetim altındadır. Çünkü miRNA'ların regülasyonundaki düzensizlikler, malign hastalıklar, romatoid artrit ve gelişim bozuklukları gibi çok çeşitli hastalıkları etkileyebilmektedir. Geçtiğimiz on yılda, çeşitli kanser türleri, kardiyovasküler ve romatizmal hastalıklar, nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere birçok hastalıkta anormal miRNA ekspresyonu tespit edilmiştir (Saguer ve Rodicio, 2011).

miRNA ekspresyonunu kontrol eden moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, protein kodlayan genlerin ekspresyonundaki varyasyonların netleştirilmesini sağlayacaktır.

1.3.3. miRNA Biyogenezi

miRNA'ların biyogenezi çok adımlı bir süreçtir. Birçok enzim ve birçok faktör bu süreçte görev alır. miRNA'lar genellikle RNA polimeraz II enzimi tarafından, çoğu, diğerinden bağımsız olarak kopyalanır, ancak bazen tandem tekrarları benzeri bir küme organizasyonu şeklinde de kopyalanabilirler. RNA polimeraz II tarafından

üretile bu uzun primer transkriptler (pri-miRNA), yaklaşık 30 baz çiftinden oluşan çift sarmallı bir gövde, bir terminal halka ve iki yanında da yapılandırılmamış tek sarmallı kuyruklar içerir. Bu pri-miRNA'lar sitoplazmaya aktarılmadan önce çekirdekte birkaç başka işleme daha tabi tutulurlar. Drosha adlı bir enzim tarafından katalize edilen ilk prosedürde, pri-miRNA'lar, 3' ve 5' uçlarında bulunan tek iplikli RNA parçalarından (ssRNA) ayrılırlar (Şekil 1.5). Bunun sonucunda yaklaşık 70 nükleotidlik bir saç tokası (hairpin) yapısına sahip prekürsör miRNA (pre-miRNA) elde edilir. Ancak son yıllarda bu işlemin sadece Drosha tarafından yapılmadığı anlaşılmıştır. Drosha, pri-miRNA'yı etkin bir şekilde işlemek için DGCR8 (DiGeorge Critical Region 8) adlı bir kofaktöre (Pasha) ihtiyaç duymaktadır ve bu ikisi birlikte mikroişlemci kompleksini (microprocessor complex) oluştururlar (İnsanlarda *DGCR8* geninin yokluğunda DiGeorge sendromu adı verilen bir hastalık oluşmaktadır) (Ergin vd., 2022).



Şekil 1.5 MikroRNA biyogenezi (Winter vd, 2009)

Çalışmalar, Drosha ve DGCR8'in miRNA üretimi için kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, Drosha ve DGCR8'in hücre içinde sıkı bir düzenlemeye tabi olduğu varsayılmaktadır (Ha vd., 2014).

Çekirdekteki miRNA'ların ikinci işlemi, Exportin 5 (XPO5) adlı bir protein tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu protein, pre-miRNA'yı daha fazla işlenmek ve olgunlaşmasını tamamlamak üzere sitoplazmaya taşır. XPO5 aynı zamanda tRNA'nın da taşınmasından sorumlu olan proteindir. RAN proteini çekirdekte GTP formuna geçtiğinde, pre-miRNA XPO5'e bağlanır. Daha sonra RAN GDP formuna geri döner ve pre-miRNA sitoplazmaya salınır. XPO5 ayrıca miRNA olgunlaşması için gerekli olan Dicer ekspresyonunu düzenleyen ökaryotik uzama faktörü 1A'nın (eEF1A) çekirdekten sitoplazmaya geçişine de aracılık eder. Sonuç olarak, XPO5, bir yandan miRNA'ların taşınmasına aracılık ederken diğer yandan Dicer ekspresyonunu modüle ederek miRNA biyogenezini ve işlevini önemli ölçüde etkilemektedir. Çekirdekte işlendikten sonra, XPO5 yoluyla sitoplazmaya taşınan miRNA'lar, yaklaşık 22-nt çift sarmallı RNA dupleksini oluşturmak üzere Dicer tarafından terminal bölgesinden ayrılırlar. Pre-miRNA'ların terminal loop bölgesi, Dicer'in N-terminal helikaz domaini ile etkileşime girer ve bu Dicer'a, spesifik miRNA'ları tanıma ve işleme yeteneği kazandırır. Dicer tarafından işlenen RNA dupleksi, AGO proteinine yüklenir ve RNA-indüklenmiş susturucu kompleksi (RISC) oluşturur. RISC, genleri sessizleştirmek için oluşturulmuş heterojen moleküler komplekslerin bir ailesidir. Dicer tarafından sitoplazmada işlenen pre-miRNA, RNA dupleksini oluşturur ve RISC oluşumunu tetikler. Prensipte RISC, sitoplazmada çift sarmallı RNA'nın ortaya çıkmasıyla indüklenir (Ha ve Kim, 2014).

RISC, hedefin farklı mekanizmalarla susturulmasını sağlar.

Bu mekanizmalardan bazıları;

- translasyonun baskılanması,
- mRNA bozulması
- DNA eliminasyonudur.

RISC'nin etki mekanizmaları organizmalar arasında biraz farklılık gösterse de, iki standart özelliği vardır: birincisi, tüm RISC'ler AGO proteinini içerir. AGO, işlevsel bir miRNA üretmek için bir miRNA dupleks dizisi seçer. işlevsel miRNA'yı oluşturacak olan zincire "kılavuz iplik", kompleksten ayrılan zincire ise "yolcu" iplik denir. İkincisi, yüklenen her RISC, hedef mRNA'sı ile baz komplementerliği sağlayan küçük bir RNA içerir. RISC molekülünün oluşumu ve işleme süreci, bu iki faktör arasında gerçekleşen basit bir bağlanma işlemi gibi düşünülmemelidir; süreç birden çok adımda gerçekleşir; küçük RNA dupleksinin AGO proteinlerine yüklenmesi (RISC öncesi), kılavuzun 3' ucuna yakın dupleks N-domaini ile aşındırılır ve daha sonra olgun RISC'yi oluşturmak için yolcu iplik çıkarılır. miRNA'lar, RISC oluşturmak için argonaute proteinleri ile etkileşime girer ve ökaryotlarda neredeyse tüm hücresel süreçlere katılırlar. AGO proteinleri küçük RNA'lar ile etkileşim halindedir ve transkripsiyondan sonra gen susturulmasında rol oynarlar. Ekspresyonları hemen hemen her hücrede olur ve miRNA'lar veya siRNA'lar ile etkileşime girer (Michlewski ve Cáceres 2019; Ergin vd., 2022).

Dicer işleminden sonra oluşan RNA dupleksleri, RISC'yi oluşturmak için spesifik AGO proteinlerine yüklenir. Daha önce miRNA'ların yalnızca AGO1'e yüklendiği ve siRNA'ların AGO2'ye yüklendiği biliniyordu. Bununla birlikte, son çalışmalar miRNA'ların hem AGO1 hem de AGO2'ye yüklendiğini bulmuştur. Drosophila'da siRNA duplekslerini AGO2'ye yüklemeyen önce RISC-Loading Complex (RLC) adı verilen bir kompleks oluşturulmalıdır. İnsanlarda RLC'nin rolü bilinmemekle birlikte, memeli hücrelerinde birincil miRNA yükleme mekanizması olarak görev yapan bir miRNA Yükleme Kompleksi (miRLC) bulunmuştur. İnsanlarda, miRNA sınıfları arasında AGO1-4'ün yüklenmesi için spesifik bir kural bulunamamıştır. Bu nedenle insanlarda tüm AGO proteinleri hem siRNA'lara hem de miRNA'lara bağlanabilir. İnsanlarda RISC yükleme çalışmaları genellikle siRNA'lar ile yapılmıştır ve bu nedenle miRNA'nın RISC yükleme adımları tam olarak bilinmemektedir (Siomi vd., 2010; Ergin vd., 2022; O'Brien vd., 2018).

Kılavuz iplik, hedefle baz eşleşmesi yapabilen fonksiyonel ipliktir ve olgun RISC'yi oluşturur. Dupleksin her iki ucunun termodinamik stabilitesi önemli bir faktördür çünkü stabil olmayan iplik fizyolojik sıcaklıkta zaten kısmen çözünmüş olacaktır. AGO proteininin N-terminal domaini, bu açık ucu stabilize eder ve MID (middle

domain) domaini, kılavuz ipliğin 5' ucunu sabitler, böylece çekirdek dizisini içeren olgun bir miRNA elde edilmiş olur. İnsan miRNA kılavuz zincirinin bir başka özelliği, 5' ucunda Urasil nükleotidi ve bu zincirde daha fazla pürin bulundurma eğilimidir; yolcu zincirinin özelliği ise 5' ucunda Sitozin nükleotidine ve daha fazla pirimidine sahip olma eğilimindedir. Kılavuz ipliği seçtikten sonra, yolcu iplik kompleksten çıkarılmalıdır. Yolcu iplik, kesmeden sorumlu AGO proteinleri (insanlarda AGO2) tarafından bölünür ve bir endoribonükleaz olan C3PO enzimi ile kompleksten çıkarılır. C3PO, yolcu ipliğin kompleksten çıkarılmasını kolaylaştırarak RISC aktivitesini artırır. Ancak insanlarda sadece AGO2 proteininin kesme aktivitesi olduğundan (AGO-1, -3 ve -4 kesici aktiviteye sahip değildir) yolcu ipliğin kesilip çıkarıldığı bu mekanizma nadiren kullanılmaktadır. Bu nedenle, genellikle diğer mekanizmalar tercih edilir. miRNA dizisindeki modifikasyonlar, mutasyonlar ve değişiklikler miRNA'ların biyogenezini ve işlevini de büyük ölçüde düzenler. miRNA dizisindeki bu yapısal değişikliklerin ve modifikasyonların meydana gelmesinin birçok yolu vardır. miRNA'ların bu şekilde düzenlenmesi, miRNA'ların hedeflerini, ifadelerini, proliferasyonunu etkileyebilir, miRNA bozulmasını indükleyebilir ve miRNA dönüşümünü düzenleyebilir. miRNA kodlayan genlerde veya hedef mRNA'nın miRNA bağlama bölgesinde meydana gelen SNP'ler (tek nükleotid polimorfizmleri), miRNA biyogenezini ve fonksiyonunu önemli ölçüde değiştirir. Özellikle miRNA'nın işlevinde önemli olan çekirdek sekansında meydana gelen bir SNP, miRNA hedefini değiştirebilir. Ayrıca, yolcu ipliği veya stem loop'u oluşturan dizideki SNP'ler, Drosha ve Dicer aracılı işlemeyi inhibe ederek miRNA biyogenezini azaltabilir. miRNA polimorfizmi birçok hastalığa neden olabilir. Onkogenlerin aktivasyonuna neden olarak tümör oluşumunu başlatabilir (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

Ek olarak miRNA'ların ifadesi, miRNA'ların 3' uçlarına RNA kuyruğu eklenerek düzenlenebilir. Bunun bilinen iki türü vardır: üridilasyon ve adenilasyon. Prensip, uridilasyon en yaygın olarak pri-miRNA ve pre-miRNA'larda görülür. RNA kuyruğu ekleme, miRNA aktivitesini hem pozitif hem de negatif olarak düzenleyen gerekli bir süreçtir (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

1.3.4. miRNA'ların Lokalizasyonu

miRNA'lar esas olarak sitoplazmada lokalize olmalarına karşın; çekirdek, çekirdekçik ve mitokondride de bulunurlar (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

1.3.4.1. Nükleer miRNA Lokalizasyonu

Olgun miRNA oluşumu için son işlem adımları sitoplazmada gerçekleştirilmesine rağmen, çekirdekte bazı olgun miRNA'lar bulunmuştur. Daha yakın tarihli çalışmalar, çoğu miRNA'nın hem çekirdekte hem de sitoplazmada lokalize olduğunu göstermiştir. (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

1.3.4.2. Ekstraselüler miRNA Lokalizasyonu

miRNA'lar ayrıca kan serumu, plazma, hücre kültürü ortamı ve diğer farklı biyoakışkanlar gibi hücre dışı ortamlarda da lokalizedir. Eksozomlarda ve sıvı biyopsilerde dolaşan bu miRNA'ların keşfi, bunların hücreler arası sinyalleşmeye katkıda bulunabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca hücre dışı miRNA'ların bazı kanser türlerinde düzenleyici rolü olabilir. Örneğin, meme kanseri hücresinden türetilen eksozomlar, miRNA olgunlaşmasına duyarlı bileşenlere sahiptir ve pre-miRNA'ları ve temel proteinleri içerir. Bu eksozomlar, kültürde bulunan hücrelerin proliferasyonunu indükleyebilir. Eksozomal miRNA'larla ilgili bir soru, bu miRNA'ların eksozomlara nasıl ayrıldığıdır. lncRNA'ların bu olayda rol oynadığı öne sürülmüştür. EXOmotif adı verilen miRNA motiflerinin, eksozomal RNA bağlayıcı proteinlerle etkileşime girerek miRNA'ların eksozomlara ayrılmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

1.3.5. miRNA Genlerinin Konumu ve Organizasyonu

miRNA'lar genellikle genomda ayrı lokuslarda kümelenirler; hem intronik hem de intergenik miRNA'lar, tek tek veya RNA grupları şeklinde bulunurlar. miRNA grupları bitişik dizilerden kopyalanan iki veya daha fazla miRNA geninden oluşur. İnsanlarda, miRNA kümeleri farklı kromozomlar üzerine dağılmıştır. En fazla sayıda

miRNA kümesine ev sahipliği yapan kromozomlar; Kromozom X, Kromozom 1, Kromozom 13, Kromozom 14, Kromozom 17 ve Kromozom 19'dur. Ayrıca, intergenik miRNA kümelerinin sayısı, intragenik olanlardan daha fazladır (76 intergenik miRNA kümesine karşı 65 intragenik miRNA kümesi), bu da intergenik bölgenin gen ekspresyonunu kontrol etmek için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca nematodlar, böcekler, kuşlar ve protistler gibi diğer organizmalarda miRNA'lar belirli kromozomlar üzerinde yoğunlaşmıştır. miRNA kümeleri, homojen ve heterojen kümeler olarak sınıflandırılır. Homojen kümeler aynı aileden olan miRNA'lardan oluşmaktadır ve hedeflerinin kontrolü doğrudan tek aşamalı hızlı ve düzenleyici bir işbirliği sergilemektedir. Ayrıca homojen kümenin miRNA'ları genellikle özdeş bir "çekirdek diziye" sahiptir. Öte yandan, heterojen kümelerin miRNA'ları, karmaşık biyolojik süreçlerde yer alan farklı miRNA ailelerinden oluşur ve bu da, homojen kümelere göre daha fazla reaksiyonu regüle ettikleri anlamına gelmektedir. Bu nedenle miRNA'lar regülasyonlarını en az üç adımda dolaylı olarak gerçekleştirirler ve regüle edilen genlerin çoğu uzun vadeli etkiler gösterirler. Birçok miRNA kümesi, prokaryotlarda bulunan operon düzenleyici sistemler gibi sıklıkla polisistronik bir şekilde kopyalanırlar. Ortak miRNA gen ekspresyonu, 50 kilobazlık (kb) bir mesafede meydana gelmektedir, bu da genleri 50 kb'den daha az olan bağımsız eksprese edilen miRNA'ların tipik olarak ortak bir transkriptten türetildiğini göstermektedir. Ek olarak, bu kümelerin ekspresyonu türe ve dokuya özgüdür. Örneğin insanlarda, kromozom 19 üzerinde bulunan 19-miRNA kümesi, yalnızca primatlarda bulunur ve fizyolojik koşullar altında sadece plasentada ve farklılaşmamış embriyonik kök ve germ hücrelerinde eksprese edilir. miRNA kümelerinin kesin kökeni belirsizdir; bununla birlikte, de novo olarak saç tokası yapısının meydana gelmesi, duplikasyon süreçleri, insersiyonlar, küme ayrılımları, delesyonlar ve yeni miRNA'ların eldesi ve ardından neofonksiyonelleştirilmesi, miRNA kümelerinin evrimsel olarak ortaya çıkmasından sorumludur (Pirela vd., 2022).

1.3.6. miRNA'ların Kararlılığının, Degredasyonunun ve Döngüsünün (Turnover) Düzenlenmesi

Hücredeki miRNA'ların miktarı, transkripsiyonel seviyede ve translasyon sonrası seviyelerde sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu düzenleyici mekanizmaların miRNA aktivitesini ve fonksiyonunu modüle ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, olgun

miRNA'ların bozunmasıyla miRNA miktarının düzenlenmesi, daha az çalışılan konular arasındadır. miRNA'ların bozunması ve yenilenmesi çoğunlukla bilinmemektedir. Önceden, miRNA'ların hücrede son derece kararlı olduğu düşünülüyordu. Olgun miRNA'ların miRNA üretiminin inhibisyonundan saatler (hatta günler) sonra hala var olduğu gerçeği bu fikre yol açmıştır. Ancak, farklı faktörlerin, miRNA degradasyonunu ve stabilizasyonu ile miRNA döngüsünü, değiştirdiği bulunmuştur. miRNA döngüsü, hücredeki miRNA seviyesinin gelişimsel, fizyolojik ve çevresel koşullara göre düzenlenmesini sağlayan bir araçtır (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

Her miRNA'nın farklı ve spesifik bir ömrü vardır. Bununla birlikte, miRNA devirleri birçok faktör tarafından kontrol edilir. Korumasız uçlar mRNA'nın ekzonükleolitik aktiviteye karşı savunmasız olmasına neden olduğundan, mRNA'ların çoğuna ekzonükleazlar tarafından degradasyonu önlemek için 5' başlık ve 3' poli (A) kuyruğu eklenir. Benzer bir durum pri-miRNA'larda da görülebilir. Bununla birlikte, olgun miRNA'ların herhangi bir 3' poli (A) kuyruğu veya 5' başlığı yoktur (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

Bitkilerde, HEN1 (Huan Enhancer1) adı verilen bir protein, miRNA'ların ve siRNA'ların 3' uçlarını metilleyerek onları 3' uç uridilasyona ve ekzonükleolitik bozunmaya karşı korur. Bu metilasyon, çift sarmallı RNA'lar AGO'ya yüklenmeden önce gerçekleşir. miRNA degradasyonu devir hızını etkiler. Ayrıca yine viral enfeksiyonlar da devir hızını etkilemektedir (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

miRNA'ların devir hızları farklı miRNA'lar arasında dakikalardan günlere kadar değişiklik gösterebilir. Devir hızları miRNA dizisine bağlıdır; miRNA spesifik – izomir spesifik. Dolayısıyla 5' guanin veya sitozin, bu pozisyonda urasilden daha yüksek devir hızına sahiptir. Stabilité ayrıca miRNA'ya özgü olabilir. Örneğin, kararsız miR-16 ailesi üyeleri dışında fare 3T3 fibroblast hücrelerindeki miRNA'lar, genellikle stabildir. Bu kararsızlık, miR-16 seviyelerinin hücre döngüsünün ilerlemesine göre değişmesine ve dolayısıyla regülasyona yardımcı olur. Devir hızları doku içeriğine de bağlı olabilir: nöronal miRNA'larda, diğer dokulardaki miRNA'lara kıyasla genellikle daha yüksek devir hızları gözlenir (Gebert vd., 2018).

miRNA destabilizasyonunun bir mekanizması, hedef RNA aracılı miRNA degradasyonu (TDMD) olarak adlandırılır. TDMD’de, bir miRNA’nın hem 5’ hem de 3’ bölgelerine kapsamlı komplementerliğe sahip hedef RNA’lar, devir hızını artırır. TDMD genellikle 3’ NTA (Non-Template Addition) veya artık ve bozulmuş miRNA’nın 3’-5’ kırılması ile ilişkilidir. Pek çok esas yapısı kararsız olan miRNA’nın, henüz tanımlanmamış hedef RNA aracılı TDMD’ye maruz kalıyor olması olasıdır. Alternatif olarak, yüksek düzeyde komplementerlik gösteren hedefler, AGO-miRNA etkileşimini destabilize edebilir ve kılavuz ipliğin salınmasını teşvik edebilir, ancak miRNA’lar yüksek miktarda “çekirdekle eşleşen” hedefler tarafından stabilize edilmiş gibi görünmektedir (Gebert vd., 2018).

1.3.7. miRNA Dizi Modifikasyonları

miRNA’ların hedefleriyle etkileşimi büyük ölçüde çekirdek dizilerinin özgülüğüne bağlıdır. ikincil RNA yapıları, RNA bağlama proteinleri (RBP) ile etkileşimlerine aracılık ederek miRNA biyogenezini etkilerler. Bir miRNA’nın veya prekürsörünün, dizisini değiştiren hücresel süreçler bu nedenle miRNA biyogenezini, aktivitesini ve devir hızını etkileyebilir (Gebert vd., 2018).

Drosha veya Dicer tarafından miRNA’ların işlenmesi, RNA düzenlemesi veya miRNA’lara nükleotitlerin eklenmesi, orijinal miRNA dizisinden farklılık gösteren ve olgun miRNA’ların uzunluğunda veya dizisinde değişikliklere neden olan izomir adı verilen yapılar üretebilir (Ergin vd., 2022).

İzomirler, uzunluk, dizi veya her ikisi bakımından farklılık gösteren olgun-miRNA varyantlarıdır. İzomirler, varyasyon yerine bağlı olarak 5’, 3’ veya polimorfik (iç) izomirler olarak sınıflandırılır ve alternatif Drosha veya Dicer işleme, RNA düzenleme veya NTA ile türetilir. Bir insan meme kanseri hücre hattında yakın zamanda yapılan bir çalışma, birçok miRNA’nın izoformunun olmadığını, miR-21-5p’nin ise 43 izoforma sahip olduğunu göstermiştir. İzomir ekspresyon paternleri, farklı kanser türlerini ayırt etmede faydalı bulunmuştur ve potansiyel biyobelirteçleri temsil etmektedir. miRNA uzunluğu ve dizisinin birincil belirleyicisi, Drosha ve Dicer tarafından yapılan bölünme işlemidir. Drosha tarafından alternatif işleme, ilk

olarak fare CD8 T hücrelerinde miR-142 ve miR-342 için rapor edilmiştir ve insan hücrelerinde yaygın olduğu gösterilmiştir (Gebert vd., 2018).

Drosha veya Dicer tarafından gerçekleştirilen alternatif bölünme, çekirdek dizinin pozisyonunu değiştirebilir ve 5' izomir üretiminin birincil mekanizmasıdır, çünkü olgun miRNA'ların 5' ucunda nükleotit eklenmesi veya çıkarılması nadirdir. Dicer kesim bölgesinde meydana gelen varyasyonlar genellikle miRNA'nın çekirdek dizisini modüle eder. Böylece kılavuz iplik seçimi önemli ölçüde değişir. Esasen, 5'-izomir üretiminin birincil mekanizması, Drosha veya Dicer tarafından yapılan işlemdir. Nadiren, olgun miRNA'ların 5' ucuna nükleotitlerin eklenmesi veya çıkarılması, çekirdek dizinin konumunu değiştirebilir. Bölünmeye yönelik 5' uç varyasyonu, sineklerde ve insanlarda miRNA hedeflerini önemli ölçüde değiştirmiştir. Ancak 5' izomir miktarı her hücre tipinde değişiklik göstermektedir. Ek olarak, belirli hücre tiplerinde belirli izomirler baskındır. Öte yandan, 3' izomirler kararlılık ve devir açısından birbirlerinden farklıdır (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

1.3.8. miRNA'nın Viral Düzenleyicileri

Viral miRNA'lar, proteinlerin aksine, immünojenik değildir ve konakta bir immün yanıtı neden olmaz ve proteinlerden daha az kodlama kapasitesi gerektirir. Ayrıca miRNA'lar, yalnızca tek bir hedefi değil, birden çok hedefi değişen derecelerde etkileyebilir. Viral miRNA'lar, konakçı hücre içinde korunan bir gen düzenleme mekanizması kullanarak viral replikasyon sağlayan hücresel bir ortamın yaratılmasına yardımcı olabilir. 200'den fazla viral miRNA, poliomavirüsler, askovirüsler ve adenovirüslerin yanı sıra herpesvirüslerde karakterize edilmiştir. Bu şekilde virüsler miRNA fonksiyonunu önemli ölçüde etkileyebilir (Michlewski ve Cáceres 2019; Ha ve Kim, 2014; Ergin vd., 2022; Siomi vd., 2010).

1.3.9. miRNA Hedef Bölgelerinin Düzenlenmesi

Protein kodlayan genlerin tümü miRNA'lar tarafından düzenlenmez. İlginç bir şekilde, temel hücresel süreçlerde yer alan bazı genler, spesifik olarak miRNA bağlanma bölgelerinden yoksun olan kısa 3'UTR'lere sahip olmaları nedeniyle miRNA düzenlemesinden kaçınmaktadır. Ancak miRNA'ların protein kodlayan

genlerin yaklaşık %30'unun translasyonunu düzenlediği tahmin edilmektedir. Bu nedenle, muhtemelen, miRNA'lar hücrel yolların tümü olmasa da çoğunu doğrudan veya dolaylı olarak etkilerler. miRNA ve regüle edilmiş mRNA'lar arasındaki kusurlu komplementerlik nedeniyle hedef genlerin doğru tahmin edilmesi, zorlaşır. Ayrıca bazı genler, farklı bir miRNA seti tarafından düzenlenebilen alternatif 3'-UTR'lere sahip olabilirler. miRNA hedeflerinin tahmini için çeşitli biyoinformatik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Tek bir miRNA ailesinin 200 kadar farklı geni düzenleyebildiği tahmin edilmektedir. Bu nedenle miRNA'ların etkilerinin pleotropik olması muhtemeldir ve anormal ekspresyonları, hücrenin homeostazını makul bir şekilde dengesizleştirebilir ve kanser dahil bir çok hastalığa katkıda bulunabilir (Medina vd., 2008).

1.3.10. miRNA'lar ve Kanser

Yapılan çalışmalar, araştırmacılara, spesifik miRNA ekspresyon kalıplarının, insan solid tümörlerini teşhis etmeye yardımcı olabileceğini, hasta prognozu ve hatta kanser tedavisi için yeni bir moleküler hedefi temsil edebileceğini düşündürmüştür (Yang vd., 2009).

Anormal şekilde eksprese edilen miRNA'lar, kanser teşhisi için faydalı biyobelirteçler ve hatta kanser tedavisi için umut verici hedeflerdir. Düzensiz miRNA'ların kökenleri kanser hücreleri arasında çeşitlilik göstermektedir. miRNA geni miRNA'yı kodlar ve transkripsiyon seviyesinde miRNA ekspresyonunu düzenler. miRNA genlerindeki bazı mutasyonlar, DNA düzeyinde, hatalı miRNA ekspresyonlarına neden olurlar. Gen mutasyonlarının neden olduğu miRNA disregülasyonu kanserlerde ve diğer hastalıklarda gözlenmiştir. Epigenetik değişiklikler de kanserde anormal miRNA ekspresyonlarına katkıda bulunan hayati faktörlerdir. Epigenetik mekanizmaların (DNA demetilasyonu ve histon asetilasyonu) miRNA ekspresyonlarını değiştirebileceği gösterilmiştir. Genetik ve epigenetik mekanizmalar dışında, transkripsiyon faktörleri de miRNA genlerinin promotör bölgelerine bağlanarak miRNA ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Transkripsiyon faktörü bağlama bölgeleri, miRNA prekürsör dizileri içinde yüksek oranda zenginleştirilmiştir. Bu da transkripsiyon faktörlerinin doğrudan primer

miRNA gen transkriptlerine veya küçük saç tokası miRNA prekürsörlerine bağlanabileceğini ve böylece bunların işlenmesini düzenleyebileceğini düşündürmektedir (Zhou vd., 2017).

miRNA kanser ilişkisini ilk ortaya koyan çalışma, kronik lenfositik lösemili hastalarda yapılmıştır. Bu hastaların çoğunda miR-15-a ve miR-16-1'in aşağı regüle edildiği veya ortadan kaldırıldığı görülmüştür. (Sylvia vd., 2009). Artan kanıtlar, miRNA'ların hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre göçü ve apoptoz gibi çeşitli temel biyolojik süreçlerin kilit düzenleyicileri olduğunu göstermektedir. Ayrıca birçok insan miRNA geninin, kırılma bölgelerinde, kanserle ilişkili genomik bölgelerde, heterozigozite kaybı bölgelerinde (LOH), minimal amplifikasyon bölgelerinde veya ortak kırılma noktası bölgelerinde lokalize olduğu gözlemlenmiştir. Kırılma bölgelerin dikkate alınması önemlidir, çünkü bunlar öncelikli translokasyon, delesyon, amplifikasyon veya ekzojen genom entegrasyonu bölgeleridir. Kırılma bölgesinin yakınında bulunan miRNA'lar, bu tür genomik değişikliklerin olası hedefleri olabilirler. Kanserle ilişkili genomik bölgeler, miRNA'ların hedef onkogenleri ve tümör baskılayıcı genleri, spesifik kanser dokularında veya hücre dizilerinde miRNA'ların önemli ölçüde fazla veya az ekspresyonu, miRNA'ların insan malignitelerinde önemli rollere sahip olduğunu ve onko/tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak hareket ettiğini gösteren birkaç potansiyel kanıttır (Sanghamitra vd., 2010).

Spesifik miRNA'ların onkogenik mi yoksa tümör baskılayıcı mı olduğu konusunda çelişkili çalışmalar vardır. Spesifik miRNA'lar bir senaryoda onkogenik olarak gösterilirken, başka bir senaryoda tümör baskılayıcı olarak gösterilebilmektedir. Belirli bir miRNA'nın çok sayıda geni etkileyebildiği göz önüne alındığında, bu durum hiç de şaşırtıcı değildir. Tek bir miRNA molekülünün, onkogenik veya tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olabilen onlarca hatta yüzlerce farklı mRNA'yı hedefleme kapasitesine sahip olduğu gerçeği dikkate alınmalıdır. Spesifik bir miRNA'nın; antiapoptotik faktörler, proapoptotik faktörler, proliferatif faktörler, metastaz promotörleri, metastaz inhibitörleri ve hematopoietik farklılaşma ile ilgili faktörler gibi birbirinin tam zıttı etkiler gösteren hedefleri bulunabilir. Bu nedenle herhangi bir miRNA'nın, tek bir kanserde net olarak onkogenik veya tümör baskılayıcı etkiye sahip olup olmayacağını belirleyen şeyin, bu onkogenlerin/tümör

baskılayıcıların ekspresyon dengesi olması muhtemeldir. Aynı kanser türü içinde bile, bir miRNA'nın onkogenik mi yoksa tümör baskılayıcı mı olduğunun değişkenlik gösterebilmektedir. Regüle edilmiş genlerin miRNA hedef bölgeleri içinde, dizi varyasyonları gösterebileceği düşünüldüğünde bu tür değişkenlikler, anlaşılabilir olmaktadır. Çok sayıda çalışma, mutasyonların ve tek nükleotid polimorfizmlerinin, mevcut miRNA hedef bölgelerinin işlevsel kaybının yanı sıra yeni miRNA hedef bölgelerini de üretebileceğini göstermiştir. Birçok tümörün genetik heterojenliği göz önüne alındığında, bir miRNA'nın tek bir tümörün farklı bölgelerinde zıt etkiler göstermesi dahi varsayımsal olarak mümkündür, ancak bunun örnekleri henüz gözlemlenmemiştir. Bu nedenle, bir miRNA'nın onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak sınıflandırılması, tüm kanser miRNA çalışmalarında dikkatle incelenmesi gereken bir unsurdur (Svoronos vd., 2016).

1.3.10.1. Tümör Baskılayıcı miRNA'lar

Onkogeneizde, kanserli hücrelerde bazı miRNA'ların ekspresyonu azalır. Bu tip miRNA'lar, tümör baskılayıcı genler olarak kabul edilirler. Tümör baskılayıcı miRNA'lar, proliferasyon, apoptoz, invazyon ve göç ile ilişkili onkogenleri aşağı regüle ederek tümör gelişimini yavaşlatmada önemli bir rol oynamaktadır (Ding vd., 2018).

Kolorektal kanser gelişimi ile ilişkili mevcut birkaç tümör baskılayıcı miRNA'nın rolleri kısaca; Lethal-7 (let-7) ailesi 12 miRNA üyesinden oluşmaktadır ve farklı türlerde yüksek oranda korunmaktadır. *Let-7 (lethal-7)*, *RAS (Rat sarcoma)*, *c-Myc (myelocytomatosis)*, *CDC34 (Cell Division Cycle 34)*, *CDC25A (Cell Division Cycle 25A)*, *CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6)*, *HMGA2 (High-Mobility Group A2)*, *LIN28* ve *LIN28B* gibi onkogenleri hedefleyerek EMT (Epitelyal-mezenkimal geçiş) sürecinde yer almaktadır. Kolon kanseri dokularında let-7, komşu kanserli olmayan dokulara kıyasla dikkate değer ölçüde aşağı regüle edilmektedir. miR-194, kolorektal kanserde sıklıkla azalan ekspresyon göstermektedir. Bu azalan ekspresyon hastaların genel sağkalımı, tümör boyutu, hücre proliferasyonu, koloni oluşumu ve tümör nodülü metastazı ile ilişkilidir. Bir başka miRNA ailesi üyesi, miR-194 ise, MAP4K4/c-Jun/MDM2 veya PDK1/AKT2/XIAP sinyal yolunun negatif

regölasyonu aracılığı ile hücre proliferasyonu, koloni oluşumu, indüklenmiş G0/G1 aresti ve indüklenmiş hücre apoptozunda görev alır ve kolorektal kanserde bir tümör baskılayıcı olarak görev yapar. Son olarak aynı primer transkriptten sentezlenen miR-143 ve miR-145'ün, kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde aşağı regüle olduğunu ve bunun çoğalma, invazyon, göç, kimyasal direnci, ankrajdan bağımsız bir şekilde büyüme ve genotoksik uyarı üzerine apoptoza uğrama gibi kanserle ilgili çeşitli hücresel süreçleri değiştirmede yer alan anti-tümörijenik aktivite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-34a'nın, önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak kolorektal kanser dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerinde aşağı regüle edildiği tespit edilmiştir (Ding vd., 2018).

1.3.10.2. Onkogenik miRNA'lar (OnkomiR)

OncomiR'ler olarak adlandırılan onkogenik miRNA'ların ekspresyon seviyeleri, farklı kanser tiplerinde artmaktadır. Bu miRNA'lar genellikle tümör baskılayıcı genleri ve/veya hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden genleri negatif olarak inhibe ederek tümör gelişimini desteklemektedir. Bununla birlikte, malign hücrelerde ekspresyonları azaldığı için tümör baskılayıcı olarak kabul edilebilecek birçok miRNA vardır. Bu miRNA'lar, hücre farklılaşmasını veya apoptozu inhibe eden onkogenleri ve/veya genleri negatif olarak inhibe ederek işlev görebilir. *Ras* ve *HMGA2*'yi negatif olarak regüle eden let-7, *BCL2*'yi negatif olarak regüle eden miR-15a ve miR-16-1, *p53*'e bağlı bir şekilde, DNA hasarı ve onkogenik stres tarafından indüklenen, apoptoza veya hücresel yaşlanmaya yol açan miR-34, meme kanseri hücrelerinde tümör baskılayıcı *tropomiyosin 1* ve *PDCD4*'ü, hepatosellüler karsinomda ise *PTEN*'i hedefleyen miR-21, apoptotik yollarda bulunan birçok geni doğrudan hedef alan bir onkogen ailesi olarak kabul edilen miR-17-92 kümesi gibi birçok miRNA, onkogenik olarak işlev görmektedir (Babashah ve Soleimani, 2011).

1.4. Çalışmanın Amacı

MikroRNA'ların keşfinden bu yana, günden güne artan bilgi birikimi, son on yılda kanser biyolojisindeki belirleyici gelişmelerden biri olmuş, yeni teşhis ve tedavi fırsatlarını ortaya çıkarmıştır. MikroRNA'ların kanserdeki önemi, miRNA hedef bağlanma bölgelerindeki değişikliklerin ve tümör hücrelerindeki miRNA işleme mekanizmasının tanımlanmasıyla iyice belirginleşmiştir (Hayes vd., 2014).

İnsan miRNA genlerinin sıklıkla, kanserlerde yer alan kırılğan genomik bölgelerde bulunması miRNA'ların, hücre göçü, çoğalması, farklılaşması ve apoptozu dahil olmak üzere temel biyolojik süreçlerdeki kritik rolleri ile ilgili uzun yıllardır yapılan sayısız çalışmalar miRNA'ları kanser araştırmalarının merkezine oturtmuştur (Calin vd., 2004; Chen ve Stallings, 2007; Wang ve Lee, 2008; Liang vd., 2016; Zhang vd., 2020; Li vd., 2022).

Yıllardır kolorektal kanser de dahil olmak üzere bir çok kanser tipinde, mikrodizilerin revers transkripsiyonu ve ardından RT-PCR ile çoğaltılması gibi çeşitli yöntemlerle gen ekspresyonu profillemeye çalışmaları yapılmakta ve spesifik miRNA ekspresyon kalıpları oluşturulmaktadır. Bu çalışmalar, düzensiz (aşağı veya yukarı regüle) miRNA ekspresyon profillerinin birçok kanser türü ile ilişkili olduğunu ve miRNA'ların tümör oluşumuna yol açan önemli süreçlerde nasıl rol aldığını göstermektedir (Croce, 2009; Dong 2011; Iorio 2012). Ayrıca, değişik tümör tipleri ve kanser evreleri arasındaki fonksiyonel farklılıkların miRNA'ların ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu miRNA'ların birer çeşidi olan miR-564 ve miR-718 bugüne kadar bir çok kanser araştırmasında çalışılmış (Leng vd., 2014; Yang vd., 2015; Mutlu vd., 2016; Liu vd., 2018) olmakla birlikte kolorektal kanserde daha önce hiç çalışılmadıkları ve kolorektal kanserdeki rollerinin aydınlatılmaya muhtaç olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, kolorektal kanserli hastaların tümörlü ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokularında miR-564 ve miR-718'in ekspresyon düzeylerini karşılaştırıp, kolorektal kanserle olan ilişkileri irdelenmiştir. Ayrıca bu iki miRNA'nın ekspresyon düzeyleri ile hastaların klinik ve patolojik verileri arasında herhangi bir korelasyon olup olmadığı da belirlenerek, her iki mikrona için, kolorektal kanserin erken tanısında ve hastalığın tedavi stratejisinin belirlenmesinde kullanılabilecek yeni birer biyolojik belirteç olup olamayacakları değerlendirilmiştir.

BÖLÜM II

LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. miR-564

Konum: 3p21.31

Sekans: kromozom: 3; NC_000003.12 (44861888..44861981)

2015 yılındaki bir araştırmada Yang ve arkadaşları, miR-564'ün akciğer kanseri hücrelerinde sıklıkla aşağı regüle edildiğini ve hücre proliferasyonunu, hücre döngüsü ilerlemesini, hareketliliğini ve akciğer kanseri hücrelerinin tümör oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca, *zic* ailesi üyesi 3'ün (*ZIC3*), miR-564'ün doğrudan hedefi olduğunu belirlemişlerdir. *ZIC3*'ün aşırı ekspresyonu, miR-564'ün akciğer kanseri hücrelerinin çoğalma ve hareketlilik kapasitesi üzerindeki baskılayıcı etkilerini bozduğu gösterilmiştir. Son olarak, doku örneklerinde miR-564 ve *ZIC3* proteininin ekspresyon seviyesini tespit etmişlerdir ve aralarında anlamlı bir negatif korelasyon bulmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda düşük miR-564 seviyelerine sahip hastaların, daha kötü bir genel sağkalım gösterdiği sonucuna varmışlardır (Yang vd., 2015).

Mutlu ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, PI3K ve MAPK gen yollarındaki disregülasyonun, kontrolsüz hücre çoğalmasını, apoptotik inhibisyonu ve metastazı teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada ters faz protein dizisi çıktısı (RPPA) analizi ile miR-564'ün hem PI3K hem de MAPK yollarını inhibe ederek, G1 arresti yoluyla hücre proliferasyonunun belirgin şekilde azalmasına neden olduğunu saptamıştır. Ayrıca, miR-564'ün ektopik ekspresyonunun epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) bloke ettiğini ve agresif meme kanseri hücre göçü ve invazyonu azalttığını göstermişlerdir (Mutlu vd., 2016).

Çin’de bir grup araştırmacı, prostat kanserli hücrelerde miR-564’ün biyolojik fonksiyonunu analiz etmek için 50 prostat kanseri hastasından topladıkları prostat kanserli dokular ve bunların bitişiğindeki normal doku örneklerinde miR-564 ekspresyonunu RT-qPCR ile değerlendirmişlerdir. Prostat kanseri proliferasyonunu, hücre döngüsü ilerlemesini ve protein ekspresyonunu saptamak için, MTT, akış sitometrisi ve Western-blot analizi yöntemlerini uygulamışlardır.

Ayrıca prostat kanseri hücrelerinin göçünü ve invazyonunu, Transwell deneyleri ile analiz etmişlerdir. Ek olarak miR-564 ve *MLLT3 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia)* arasındaki korelasyon, lusiferaz raportör testi ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma ile, miR-564’ün prostat kanseri hücrelerinde düzensiz olduğunu ve prostat kanseri hücre çoğalmasında, hücre döngüsünün ilerlemesinde, hücre invazyonunda ve göçünde bir baskılayıcı olarak görev yaptığını, miR-564 ekspresyonunun prostat kanserli dokularda bitişik normal dokulara kıyasla oldukça düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular, miR-564’ün prostat kanseri ilerlemesinde tümör baskılayıcı bir işleve sahip olduğunu ve prostat kanseri için potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini göstermektedir (Meng vd., 2017).

Guo ve arkadaşları, mide kanserinde anormal şekilde eksprese edilen miRNA’ları tanımlamak için iki genel miRNA ekspresyon profili veri setini inceleyerek, mide kanserinde anormal şekilde eksprese edilen miRNA’ları tanımlamışlardır. Bu miRNA’lardan biri olan miR-564’ün, mide kanserinde aşağı regüle edildiğini tespit etmiş ve bunu, RT-qPCR analizi ile meme kanserli hastalardan alınan doku örneklerinde doğrulamışlardır. Daha sonra çeşitli kanser sinyal yollarında işlevsel olarak zengin olduğu belirlenen transkripsiyon faktörü E2F3 de dahil olmak üzere miR-564’ün hedeflerini, biyoinformatik olarak tahmin etmişlerdir. Ayrıca miR-564’ün aşırı ekspresyonunun, E2F3’ün mRNA ve protein seviyesine ek olarak, E2F3’ün 3’-UTR bölgesini taşıyan bir lusiferaz raportörünün aktivitesini de azaltması, miR-564’ün doğrudan E2F3’ü hedeflediğini göstermektedir. Bu veriler, araştırmacılara miR-564’ün E2F3’ü hedefleyerek mide karsinogenezinde bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (Guo vd., 2017).

İnsan osteosarkom (OS) hücre dizilerinde ve hastalarda miR-564'ün aşağı regüle edildiğini bildiren bir çalışma yapılmıştır. Ru ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada osteosarkom hücrelerinde miR-564'ün aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu baskıladığı ve hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir. Araştırmacılar, *Akt* (*serin/treonin kinaz*)'yi mekanistik olarak miR-564'ün doğrudan hedefi olarak belirlemişlerdir. Yüksek oranda eksprese edilen miR-564'ün, hem mRNA hem de protein seviyesinde *Akt* ekspresyonunu azalttığı ve sonuç olarak, osteosarkom hücrelerinin glikolizinde *Akt*'nin temel rolünü inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Özellikle, miR-564'ü aşırı eksprese eden hücrelerde *Akt* ekspresyonunun restore, bu hücrelerdeki glikoz metabolizmasının ve hücre büyümesinin düzeldiği saptanmıştır. Bu sonuçlar, miR-564'ün, doğrudan *Akt*'yi hedefleyerek glikoliz ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, osteosarkom tedavisinde miR-564-*Akt* ekseninin potansiyel bir hedef olabileceğini göstermiştir (Ru vd., 2017).

Osteosarkomla ilgili bir başka çalışmada, bir grup araştırmacı osteosarkom hastalarında miR-564'ün prognostik önemini incelemiştir. Araştırmacılar, OS dokularında ve normal kemik dokularında miR-564'ün ekspresyon seviyelerini saptamak için RT-PCR testi, miR-564 ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikler arasındaki korelasyonu belirlemek için Pearson χ^2 -testi, OS hastalarının hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım oranlarını tespit etmek için Kaplan-Meier yöntemi ve sağkalım ile ilgili faktörleri değerlendirmek için Cox regresyon analizini kullanmışlardır. Sonuçlar miR-564 seviyesinin, eşleştirilmiş kanserli olmayan kemik dokularına kıyasla OS dokularında önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Ayrıca düşük miR-564 ekspresyonunun ileri klinik evre ve uzak metastaz ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Ek olarak sağkalım analizleri, düşük miR-564 ekspresyonuna sahip hastaların, yüksek miR-564 ekspresyonuna sahip olanlara göre daha kısa bir genel sağkalıma ve hastalıksız sağkalıma sahip olduğunu göstermiştir. Araştırmacıların verileri ilk kez aşağı regüle edilmiş miR-564'ün OS'nin yeni bir prognoz tahmin belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Gao ve Xu, 2018).

Liang ve arkadaşları tarafından, kanserli olmayan komşu dokularda, hepatosellüler karsinomlu dokulara kıyasla miR-564 ekspresyonunun daha düşük olduğu ve miR-

564 ekspresyonunun tümör boyutu, tümör sayısı ve damar invazyonu ile ilişkili olduğunu gösterdikleri bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Biyoinformatik analizler araştırmacılara, düşük miR-564 seviyelerinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Liang ve arkadaşları *GRB2*'nin hepatosellüler karsinomlu hücre dizilerinde miR-564'ün doğrudan hedef geni olduğunu bulmuşlardır. *GRB2*, hepatosellüler karsinomlu dokularda yüksek oranda eksprese edilmiş ve miR-564 ekspresyon seviyeleri ile negatif korelasyon göstermiştir. *GRB2*, *GRB2*-siRNA tarafından aşağı regüle edildiğinde, hepatosellüler karsinomlu hücrelerin proliferasyonu, invazyonu ve metastazı bozulmuş ve *GRB2* ekspresyonunun restore edilmesi miR-564'ün inhibe edici etkilerini kısmen tersine çevirmiştir. Araştırmacılar tarafından yapılan Western blot analizi, miR-564'ün aşırı ekspresyonunun hepatosellüler karsinomlu hücre dizilerinde *GRB2* ekspresyonunu azalttığını ve ERK1/2 ve AKT fosforilasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca miR-564'ün aşırı ekspresyonu E-kadherini yukarı regüle etmiş, N-kaderin ve vimentini aşağı regüle etmiştir. Sonuçlar miR-564'ün, *GRB2*-ERK1 / 2-AKT eksenini hedefleyerek hepatosellüler karsinomlu hücrelerinin malign fenotipini inhibe ettiğini göstermektedir. Bu çalışma miR-564'ün, hepatosellüler karsinom için bir prognostik belirteç ve terapötik hedef olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Liang vd., 2017).

Sun ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları bir çalışma ile sinovyal mezenkimal kök hücrelerin (SMSC'ler) kondrositlere çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik etmede miR-564'ün rolünü araştırmışlardır. SMSC'lerde miR-564 ekspresyonunu qRT-PCR ile belirlemişlerdir. Araştırmacılar tarafından SMSC'ler 3 hafta boyunca kıkırdak oluşturmak üzere indüklenmiştir. İndüklenen kondrositlerin morfolojisi, hematoksilen, eozin ve toluidin mavisi ile boyanarak gözlemlenmiş ve hücre canlılığı kaydedilmiştir. SMSC'lerin kondrosit farklılaşmasının genler ve proteinler (*COL2A1*, *Aggrecan*, *SOX9*, *TGF- β 1* ve *Smad4*) ile ilişkisi değerlendirilmiştir. miR-564'ün kondrojenik etkisi, hedef gen *TGF- β 1* bloke edildikten sonra incelenmiştir. İndüklenen hücrelerin morfolojisinin ve özelliklerinin, kondrositlerin ki ile tutarlı olduğu görülmüştür. Kıkırdak farklılaşması ile ilgili genlerin nispi ifadesi, *TGF- β 1*'i bloke ettikten sonra azalmıştır. Araştırmacılar miR-564'ün aracılık ettiği aşağı regülasyonun, *TGF- β 1*'i hedefleyerek SMSC'lerin kondrositlere farklılaşmasını ve çoğalmasını teşvik edebileceğini göstermişlerdir (Sun vd, 2018).

Teng ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları araştırmada sistemik lupus eritematoz hastalarında (SLE) diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA ve hedef genlerini analiz etmek için biyoinformatik yöntemler kullanmıştır. SLE hastalarında diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA'ların monosit türevli dendritik hücrelerin farklılaşması ve olgunlaşması üzerindeki etkilerini ve mekanizmalarını araştırmak için in vitro deneyler yapmışlardır. Biyoinformatik analiz, miR-564'ün SLE hastalarında yukarı regüle edildiğini ve *TP53*'ün miR-564'ün temel hedef geni olduğunu göstermiştir. miR-564'ün ekspresyon seviyesi, monositlerin Mo-DC hücrelerine farklılaşması ve olgunlaşması sırasında artan bir eğilim göstermiştir. miR-564 antagomir (anti-miRNA) transfeksiyonunun, Mo-DC hücrelerinin farklılaşması, olgunlaşması ve proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermişlerdir. *TP53*'ün ekspresyonu miR-564 tarafından negatif olarak regüle edilmektedir. Yüksek oranda eksprese edilen miR-564, *TP53* ekspresyonunu negatif olarak düzenleyerek Mo-DC hücrelerinin olgunlaşmasını ve çoğalmasını desteklemektedir (Teng vd., 2021).

2.2. miR-718

Lokalizasyon: Xq28

Sekans: Kromozom: X; NC_000023.11 (154019920..154019989, komplement)

Yumurtalık kanseri dahil olmak üzere çeşitli malignitelerde, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün (VEGF) onkojenik aktivasyonu bilinmektedir. 2014 yılında Leng ve arkadaşları yumurtalık kanserinde VEGF'nin regülasyonunda miRNA'nın rolünü araştırmıştır. Bu çalışmada Leng ve arkadaşları miR-718'in düşük seviyelerde eksprese edildiğini ve bu durumun yumurtalık kanseri örneklerinde görülen yüksek VEGF ekspresyonu ile ters orantılı olduğunu bulmuştur. miR-718'in ayrıca VEGF ekspresyonunu doğrudan hedeflediği ve bastırdığı bilinmektedir. Ek olarak, miR-718'in ektopik ifadesi, hem in vitro hem de in vivo olarak yumurtalık kanseri proliferasyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca VEGF ekspresyonu, fosforile edilmiş AKT seviyelerini artırarak miR-718'in yumurtalık kanseri üzerindeki etkisini tersine çevirebilmektedir. Sonuçlar, miR-718'in VEGF'yi baskılayarak yumurtalık kanserine karşı inhibe edici etkiler sergilediğini göstermektedir. Yeni tanımlanan bu

miR-718/VEGF bağlantısı, yumurtalık kanserini tedavi etmek için potansiyel bir terapötik hedef sağlamaktadır (Leng vd., 2014).

Kaposi sarkomu (KS) ile ilişkili herpes virüsü (KSHV) onkoproteini K1 ile indüklenen anjiyogenezdeki HIV-1 Nef proteini artışının incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Endotel hücrelerinde Nef'in hem içsel hem de ektopik ekspresyonunun, vasküler tüp oluşumunu ve hücre proliferasyonunu kolaylaştırdığı görülmüş ve anjiyogenezi genişletmek için K1 ile sinerji oluşturduğu bir tavuk korioallantoik membran modelinde gösterilmiştir. Mekanistik çalışmalar, Nef ve K1'in *PTEN*'i aşağı regüle ederek PI3K/AKT/mTOR sinyal yollarını sinerjistik olarak etkinleştirdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, Nef ve K1, mRNA'sının 3' UTR'sindeki bir çekirdek diziyi doğrudan hedefleyerek *PTEN* ekspresyonunu inhibe eden hücresel miR-718'i indüklemiştir. miR-718 ekspresyonunun inhibisyonu, *PTEN* sentezini arttırmış ve Nef ve K1 ile indüklenen anjiyogenez ve tümörigenezin sinerjistik etkisini bastırmıştır. Bu sonuçlar, miR-718'in *PTEN*'i hedefleyerek, AKT/mTOR sinyal yolunun aktivasyonu ile Nef ve K1 kaynaklı anjiyogeneze aracılık ettiğini göstermiştir. Bu çalışma ile AIDS-KS'de miR-718/AKT/mTOR ekseninin önemli bir rolü gösterilmiştir ve bu nedenle ilgi çekici bir terapötik hedefi temsil edebileceği belirtilmiştir (Xue vd., 2014).

Özofagus skuamöz hücreli karsinom (ESCC) hastalarında plazma miR-718'in ekspresyon düzeyini ve tanısal değerini araştırmak için 2016 yılında bir çalışma yapılmıştır. 120 kişilik bir ESCC hastası grubu ve 51 kişilik sağlıklı kontrol grubunda plazma miR-718 ekspresyon seviyelerini incelemek için qRT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Eşleştirilmiş hastalar arasındaki ameliyat öncesi ve ameliyat sonrası plazma miR-718 ekspresyon seviyesi farkı karşılaştırılmıştır. Plazma miR-718 ekspresyon seviyeleri ile klinikopatolojik özellikler arasındaki korelasyonun tespiti için daha ileri analizler yapılmıştır. Plazma miR-718'in, ESCC'deki tanı gücünü değerlendirmek için ROC eğrisi analizi yapılmıştır. Sonuçlar ESCC hastalarının plazma miR-718 ekspresyon seviyesinin, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir. Ameliyat sonrası, hastaların plazma miR-718 ekspresyon seviyesinin ameliyat öncesi ile karşılaştırıldığında, önemli ölçüde yukarı regüle edildiği saptanmıştır. Plazma miR-718 ekspresyon seviyesi, lenf nodülü metastazı ve TNM evresi ile ters orantılı olarak görülmüştür. Sonuçlar araştırmacılara

plazma miR-718'in, ESCC hastalarında aşağı regüle edildiğini ve ESCC için potansiyel bir teşhis belirteci olarak hizmet edebileceğini göstermiştir (Sun vd., 2016).

Kalantari ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları bir araştırma ile, *IRAK1* geninin 5'UTR'si ile örtüşen evrimsel olarak korunmuş miR-718'in, lipopolisakkaritler tarafından indüklendiğini ve makrofajlarda inflamasyonun negatif düzenleyicisi olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar miR-718'in, *PTEN*'i hedefleyerek doğuştan gelen bağışıklık tepkilerine nasıl aracılık ettiğini ve makrofajlardaki iltihaplanma tepkisinin yoğunluğunu hangi mekanizma ile kontrol ettiğini saptamışlardır. Sonuçlar lipopolisakkarit ile aktive olan hücrelerde miR-718'in rolünü anlamanın, sepsis için yeni tedavi yöntemlerinin tasarımına yardımcı olabileceğini ve sepsisin ötesinde inflamatuvar hastalıkları tedavi etmek için Anti-miR-718'in kullanımının potansiyel olarak genişletebileceğini göstermiştir (Kalantari vd., 2017).

2018 yılında Wang ve arkadaşları tarafından papiller tiroid kanseri örneklerinde miR-718 ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Ardından *PDPK1* (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*)'in 3'-UTR'si, miR-718'in bir hedefi olarak tanımlanmıştır. Wang ve arkadaşları miR-718'in p-Akt, Akt, p-mTOR ve mTOR ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. miR-718'in sırasıyla Akt-mTOR yolu bileşenlerinin seviyelerini negatif olarak düzenlediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar daha sonra miR-718'in papiller tiroid kanseri hücre davranışı üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Sonuçlar, miR-718'in papiller tiroid kanseri hücre çoğalmasını, göçünü ve invazyonu negatif olarak düzenlediğini ortaya koymuştur. Ek olarak miR-718'in, muhtemelen Akt-mTOR yoluyla hücre glikoz metabolizmasını inhibe ettiği bulmuşlardır. Son olarak, *PDPK1*'in, miR-718 tarafından indüklenen papiller tiroid kanseri hücre inhibisyonunu kurtarabileceğini göstermişlerdir (Wang vd., 2018).

2018 yılında Liu ve arkadaşları tarafından 141 mide kanser dokusunda *PTEN* ve miR-718'in ekspresyonu, sırasıyla immünohistokimya ve qRT-PCR ile saptanmıştır. Daha sonra mevcut doku örnekleri ve tıbbi kayıtlar, ameliyattan 5 ay sonra mevcut takipler ve ciddi perioperatif komplikasyon ve başka tümör olmaması gibi kriterlere göre hastalar kaydedilmiştir. *PTEN* mRNA seviyesinin saptanması için başka bir 12 çift

taze tümör dokusu ve bitişik doku toplanmıştır. Ayrıca *PTEN* ve miR-718'in prognostik öneminin belirlenmesi için, tek değişkenli ve çok değişkenli analiz, *PTEN*'in miR-718 tarafından regülasyonunun değerlendirilmesi için lusiferaz raportör testi ve miR-718'in mide kanser proliferasyonu ve invazyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için ise MTT testi ve Transwell testi uygulanmıştır. Sonuçlar düşük *PTEN* ekspresyonunun ve yüksek miR-718 ekspresyonunun, olumsuz prognoz ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir ve her ikisi de mide kanserli hastaların daha kötü prognozunu öngören biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Artan miR-718 ekspresyonunun, *PTEN* ekspresyonunu azaltabileceği, böylece PI3K/Akt sinyalini artırabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, miR-718 ile transfekte edilen mide hücrelerinin proliferasyon ve invazyon yeteneklerinin, kontrol miRNA ile transfekte edilenlere kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Liu ve arkadaşları bu çalışma ile miR-718'in yukarı regülasyonunun, *PTEN*'i doğrudan aşağı regüle ederek PI3K/Akt sinyalini artırabileceğini, böylece mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonu teşvik edebileceğini göstermişlerdir (Liu vd., 2018).

SEMA3B-AS1 (*semaphorin family Sema3b*)'in mide kardial adenokarsinomunda tümör baskılayıcı bir kodlamayan RNA (lncRNA) olduğu bildirilmiştir. 2019 yılında Zhong ve arkadaşları SEMA3B-AS1'in hepatosellüler karsinomla (HCC) olası ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmada SNU-398 ve SNU-182 HCC hücre hatları ve hücre kültürü ortamı olarak RPMI 1640 ortamı (%10 FBS) kullanıldı. SEMA3B-AS1'in kanserli olmayan dokulara kıyasla HCC dokularında aşağı yönlü regüle edildiğini ve hepatit B virüsü ve hepatit C virüsü enfeksiyonlarından etkilenmediğini bulmuşlardır. Ek olarak, SEMA3B-AS1 ekspresyonunun kanser gelişiminden etkilenmediğini ve düşük SEMA3B-AS1 seviyelerinin, düşük sağkalım ile yakından ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. HCC dokularındaki SEMA3B-AS1, miR-718 ile ters orantılı olduğunu ve *PTEN* ile pozitif korelasyon gösterdiğini saptamışlardır. HCC hücrelerinde, SEMA3B-AS1'in aşırı ekspresyonunu, yukarı regülasyon ile sonuçlanırken, miR-718'in aşırı ekspresyonu, aşağı regüle edilmiş *PTEN* ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Ek olarak araştırmacılar, miR-718'in aşırı ekspresyonunun, SEMA3B-AS1'in aşırı ekspresyonunun etkilerini hafiflettiğini saptamışlardır. SEMA3B-AS1 ve aşırı *PTEN* ekspresyonu, HCC hücrelerinin çoğalma hızının düşmesine neden olurken, miR-718'in aşırı ekspresyonu, HCC hücrelerinin çoğalma hızını arttırmıştır. Ek olarak, miR-718'in aşırı ekspresyonu,

SEMA3B-AS1'in aşırı ekspresyonunun etkilerini hafifletmiştir. Bu nedenle miR-718'in, hepatoselüler karsinom hücrelerinin proliferasyonunu düzenlemek için lncRNA SEMA3B-AS1 ve *PTEN* arasındaki dolaylı etkileşime aracılık edebileceği çıkarımında bulunmuşlardır (Zhong vd., 2019).



BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1. Doku Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Çalışmamızda, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda opere edilen ve kolorektal kanser tanısı konulan 80 hastadan elde edilen, sağlıklı ve tümörlü kolon ve/veya rektum dokuları kullanılmıştır. Dokular elde edilirken araştırma için gönüllü olan hastalar bilgilendirilip, bilgilendirilmiş gönüllü olur formları okutulup imzalatıldıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Her bir bireyden alınan doku örnekleri içerisinde RNAlater (Thermo Fisher Scientific) bulunan eppendorf tüplerde -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'nun 2021/83 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

3.2. Dokudan RNA izolasyonu

Kolorektal kanserli 80 hastadan alınan tümörlü ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokulardan miRNA'lar üretici firmanın protokol talimatlarına uygun olarak, mirVana™ miRNA Isolation Kit, with phenol (AM1560, Invitrogen, USA) ile izole edilmiştir.

3.3. miRNA'dan cDNA eldesi

İzole edilen miRNA'lardan cDNA sentezi, TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (A28007, Applied Biosystems, USA) kullanılarak Reverz Transkriptaz PCR metodu ile gerçekleştirilmiştir.

3.4. Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

miR-564 ve miR-718'in ekspresyon düzeyleri TaqMan™ Advanced miRNA Assay (A25576, Applied Biosystems, USA) ve Master Mix: TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (4444557, Applied Biosystems, USA) kullanılarak Real Time PCR ile belirlenmiştir. İnternal kontrol olarak RNU6 kullanılmıştır. Ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılmıştır (Livak ve Schmittgen 2001).

3.5. İstatistiksel Analizler ile Verilerin Değerlendirilmesi

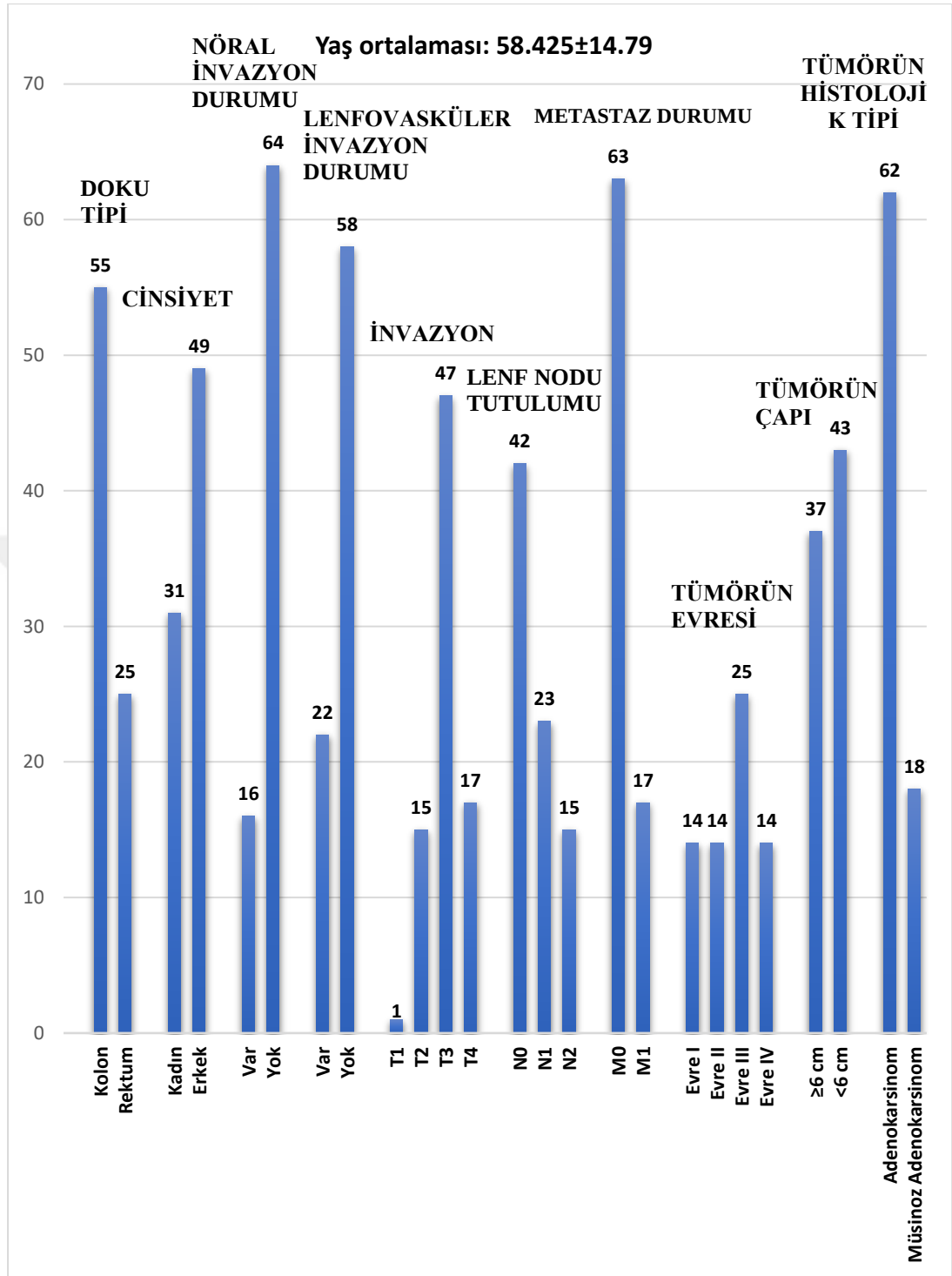
İstatistiksel analizler SPSS (sürüm 22.0; IBM Corp.) yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Tümörlü ve komşu sağlıklı dokulardaki miRNA ekspresyon düzeyleri, tümörlü dokulardaki ΔC_t değerleri ile normal dokulardaki ΔC_t değerlerinin paired t testi ile analiz edilmesi sonucunda belirlenmiştir. miR-564 ile miR-718 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki ise Spearman korelasyon testi uygulanarak saptanmıştır. p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BÖLÜM IV

BULGULAR

4.1. Çalışma Örneklerinin Klinik ve Patolojik Verileri

Çalışmamızda Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndan örnekleri alınan 80 kolorektal kanser hastasının tümörlü ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokularında miR-564 ve miR-718 ekspresyon seviyeleri arasındaki farklar incelenmiştir. Dokuların elde edildiği hastaların yaş ortalaması $58 \pm 14,79$ olarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullandığımız dokuların 55'i kolon ve 25'i ise rektum kanserli hastalara aittir. Hastalarımızın 31' ini kadınlar ve 49'unu erkekler oluşturmaktadır. Hastaların 64'ünde nöral invazyon görülmüş, 16'sında ise görülmemiştir. TNM kanser sınıflandırma yöntemine göre, invazyonların yalnızca 1'i T1 evresinde iken, invazyonların en yoğun olduğu T3 evresinde 47 hasta ve bunu sırasıyla T3 evresinde 17 ve T2 evresinde 15 hasta izlemektedir. Lenf nodu tutulumunda N0 evresinde 42, N1 evresinde 25 ve N2 evresinde 23 hasta bulunmaktadır. Metastaz durumunda ise 63 hasta M0'da ve 27 hasta M1 evresinde bulunmaktadır. Tümör evrelerine göre gruplandırıldığında Evre I'de 14, Evre II'de 14, Evre III'te 25 ve Evre IV'te 14 kolorektal kanser hastası bulunmaktadır. 37 hastada tümörün çapı 6 cm ve altındayken, 43 hastada tümör çapının 6 cm'in üzerinde olduğu görülmektedir. Tümörler histolojik tipleri açısından değerlendirildiğinde ise 62'sinin adenokarsinom geriye kalan 18'inin ise müsinöz karsinom olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız dokulara ait klinik, demografik ve patolojik veriler Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Hastaların klinik, demografik ve patolojik dataları

M0: Uzak metastaz yok, **M1:** Bir veya daha fazla bölge veya organda veya peritonda metastaz varlığı;

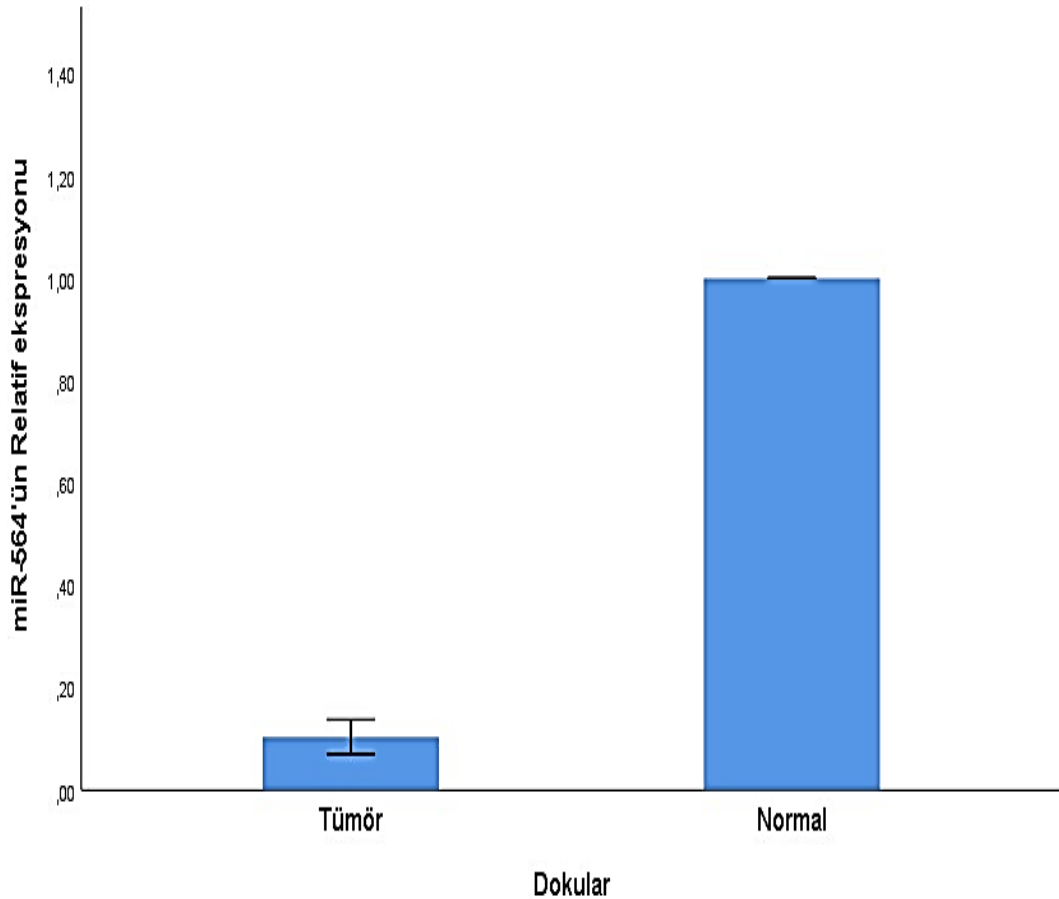
N0: Lenf nodu metastazı yok, **N1:** 1-3 perikolik lenf tutulumu, **N2:** 2-4 perikolik ve perirektal tutulum;

T1: Submukoza invazyonu yapmış tümör, **T2:** Muskularis propriya invazyonu yapmış tümör, **T3:** Tümör muskularis propriayı geçerek perikolorektal yağlı doku invazyonu yapıyor, **T4:** Tümör visseral periton veya komşu organ veya yapılara yapışık veya invazyon yapıyor)

4.2. Kolorektal Kanserli Hastaların Dokularındaki miR-564 ve miR-718

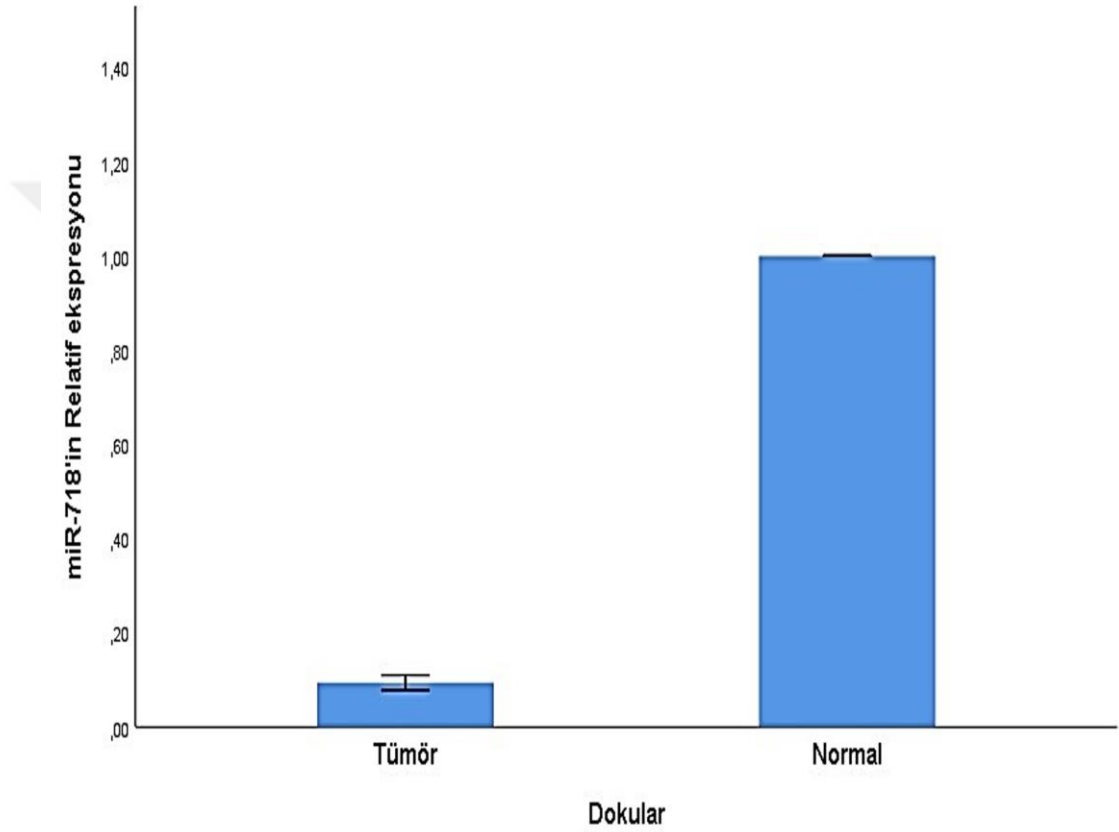
Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmamızda kolorektal kanserli hastaların dokularındaki miR-564 ve miR-718 ekspresyon düzeyleri, kat değişimleri (fold change) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). 80 kolorektal kanserli hastanın dokularından izole edilen miRNA'lar Realtime PCR metodu ile analiz edilmiştir. miR-564 için, tümörlü dokulardaki ortalama ΔCt değeri 8.6 ± 1.9 , normal dokulardaki ortalama ΔCt değeri ise 4.3 ± 1.9 olarak bulunmuştur. Tümörlü ve normal dokulardaki ΔCt değerleri paired t testi ile kıyaslanmıştır ve miR-564'ün ekspresyon düzeyinin tümörlü dokuda normal dokuya kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalış gösterdiği bulunmuştur ($p=0.000$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.2 miR-564'ün relatif ekspresyonu

Bu çalışmada ekspresyon düzeyi araştırılan diğer bir mikroRNA olan miR-718'in tümörlü dokulardaki ortalama ΔCt değeri 6.6 ± 0.9 , normal dokulardaki ortalama ΔCt değeri ise 2.9 ± 3.0 olarak hesaplanmıştır. Tümörlü ve normal dokulardaki ΔCt değerleri paired t testi ile kıyaslanmıştır ve miR-718'in ekspresyon düzeyinin normal dokuya kıyasla tümörlü dokuda istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalış gösterdiği bulunmuştur ($p=0.000$) (Şekil 4.2).



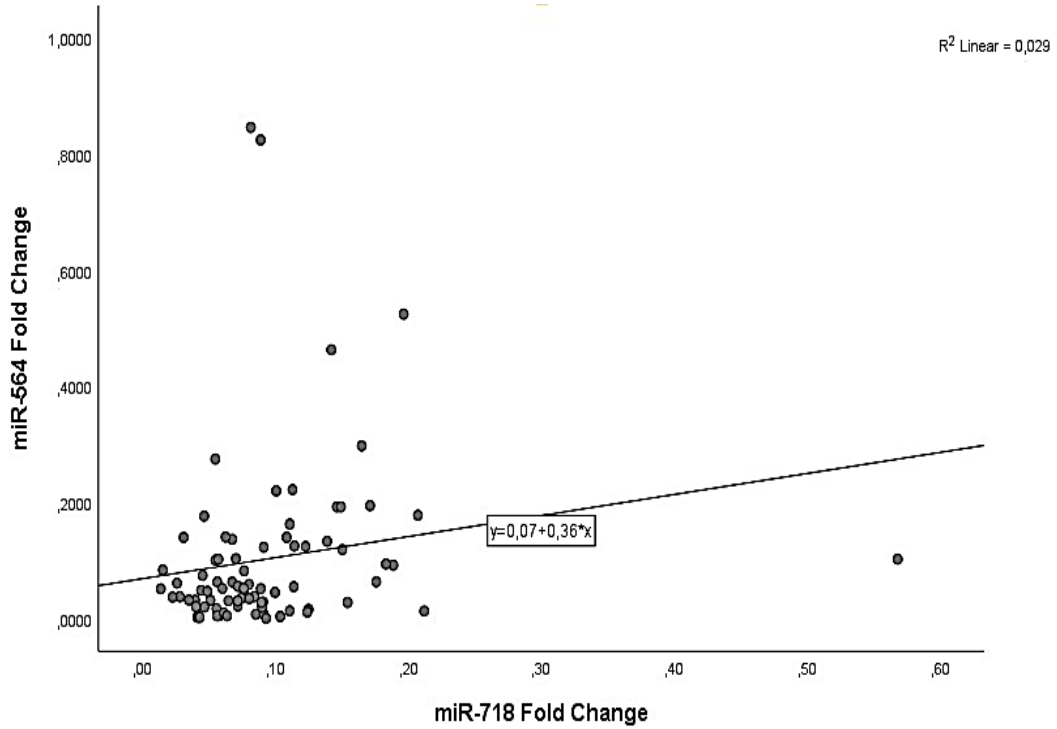
Şekil 4.2 miR-718'in relatif ekspresyonu

4.3. miR-564 ve miR-718 Ekspresyon Düzeyleri Arasındaki Korelasyon

miR-564 ve miR-718 ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile belirlenmiştir. miR-564 ve miR-718'in belirlenen fold change (kat değişim) değerleri Spearman korelasyon testi ile analiz edilmiş ve her iki miRNA ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde korelasyon saptanmıştır (Spearman's $\rho=0.304$, $p=0.006$) (Şekil 4.3).

Tablo 4.1 miR-564 ve miR-718 ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman korelasyon testi

Korelasyonlar (Spearman korelasyon testi)				
			miR-564 FoldChange	miR-718 FoldChange
Spearman's rho	miR-564 FoldChange	Korelasyon Katsayısı	1,000	0,304**
		Sig. (2-tailed)	.	0,006
		N	80	80
	miR-718 FoldChange	Korelasyon Katsayısı	0,304**	1,000
		Sig. (2-tailed)	0,006	.
		N	80	80
**. Korelasyon 0,01 düzeyinde anlamlıdır. (2-tailed).				



Şekil 4.3 miR-718 ve miR-564 ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyon

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Kanser günümüzde insan hayatını tehdit eden sorunların başında gelmektedir. Kanser, protein kodlayan genlerin yanı sıra, kodlamayan genleri de içeren birçok moleküler yolağı etkilemektedir. Kolorektal kanser dünyada 2. sıradaki en çok ölüme sebep olan kanser türüdür. Kolorektal kansere bir çok etmen sebep olabilmektedir. Bunlardan bazıları da genetik faktörlerdir.

miRNA'lar, mRNA'lara bağlanarak transkripsiyon sonrası seviyede gen ekspresyonunu düzenleyen kısa, kodlamayan, tek sarmallı RNA molekülleridir. İnsanlarda, bir miRNA molekülü çoğunlukla 22 nükleotit uzunluğundadır, ancak 19-25 nükleotit uzunluğunda moleküller de tanımlanmıştır. miRNA'ları kodlayan genler, protein kodlayan genlerin intronlarında veya ekzonlarında ve intergenik bölgelerde, genellikle yüksek kararsızlığın olduğu bölgelerde bulunurlar. miRNA'lar hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, anjiyogenez, göç, apoptoz ve onkogeneze gibi kritik biyolojik süreçleri kontrol ederler (Smolarz vd, 2022). miRNA'lar, insan genlerinin yaklaşık % 60'ının ekspresyonunu düzenlemektedir (Liu vd. 2014).

İnsan kanserlerinde miRNA'ların ekspresyonları, kromozomal anormallikler, epigenetik değişiklikler, mutasyonlar, polimorfizmler (SNP'ler) ve miRNA biyogenez mekanizmasındaki kusurlar dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla değiştirilebilirler. miRNA'ların bu değiştirilmiş ekspresyonları, söz konusu moleküllerin onkogenik veya tümör baskılayıcı potansiyelini açığa çıkarmaktadır. İnsan malignitelerinin pek çoğunda miRNA'ların anormal ekspresyon profillerinin rol oynadığı bir çok araştırmada ortaya konulmuştur (Visone ve Croce, 2009).

Birkaç sebepten dolayı miRNA'lar kanserin potansiyel belirteçleri olarak görülmektedir;

- İlk olarak, miRNA'lar çeşitli vücut sıvılarında bulunmaları sebebiyle inceleme için her zaman hazır olan moleküllerdir.

- İkincisi, miRNA'ların yüksek biyolojik stabilitesi, tespit edilmelerini kolaylaştırır.
- Son olarak, miRNA'lar tümör gelişiminin tüm aşamalarını regüle ederler ve çoğu durumda dokuya özgü ekspresyon göstermektedirler.
- Tedavi sırasında prognostik ve prediktif biyobelirteçler olarak miRNA'ların kullanımı özellikle klinik olarak anlamlı görünmektedir. Belirli miRNA'ların ekspresyon profillerindeki değişikliklerin izlenmesi, kanser hücrelerinin erken tanımlanmasına yardımcı olabileceği gibi, hastalık veya tedavi için bir prognostik faktör olarak hizmet edebilecektir (Smolarz vd, 2022).

Bu tez çalışmasında kolorektal kanser hastalarında miR-564 ve miR-718'in ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 80 kolorektal kanserli hastanın tümörlü ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokularında miR-564 ve miR-718 ekspresyon düzeyleri Real-time PCR metodu kullanarak analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda miR-564'ün ekspresyonunun tümörlü dokularda normal dokulara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalış gösterdiği saptanmıştır ($p=0.000$). Bizim çalışmamızdan elde edilen bulgularla paralel olarak Yang ve arkadaşları, miR-564'ün akciğer kanseri A549 hücre hattında sıklıkla aşağı regüle edildiğini ve hücre proliferasyonunu, hücre döngüsü ilerlemesini, hareketliliğini ve akciğer kanseri hücrelerinin tümör oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiğini bulmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda düşük miR-564 seviyelerine sahip hastaların, daha kötü bir genel sağkalım gösterdiği sonucuna varmışlardır (Yang vd. 2015). Benzer şekilde Çin'de bir grup araştırmacı, prostat kanserli hücrelerde miR-564'ün biyolojik fonksiyonunu analiz etmişler ve 50 prostat kanseri hastasından topladıkları prostat kanserli dokular ve bunların bitişindeki normal doku örneklerinde miR-564 ekspresyonunu RT-qPCR ile değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma ile, miR-564'ün prostat kanseri hücrelerinde düzensiz olduğunu ve prostat kanseri hücre çoğalmasında, hücre döngüsünün ilerlemesinde, hücre invazyonunda ve göçünde bir baskılayıcı olarak görev yaptığını, miR-564 ekspresyonunun prostat kanserli dokularda bitişik normal dokulara kıyasla oldukça düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgular, miR-564'ün prostat kanseri ilerlemesinde tümör baskılayıcı bir işleve sahip olduğunu ve prostat kanseri için potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini göstermiştir (Meng vd 2017). Liang ve arkadaşları, kanserli olmayan komşu

dokularda, hepatosellüler karsinomlu dokulara kıyasla miR-564 ekspresyonunun daha düşük olduğu ve miR-564'ün tümör boyutu, tümör sayısı ve damar invazyonu ile ilişkili olduğunu gösterdikleri bir araştırma gerçekleştirilmiştir (Liang vd, 2017). Bir başka çalışmada araştırmacılar, osteosarkom (OS) hastalarında miR-564'ün prognostik önemini incelemiştir. Sonuçlar miR-564 seviyesinin, eşleştirilmiş kanserli olmayan kemik dokularına kıyasla OS dokularında önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Ayrıca düşük miR-564 ekspresyonunun ileri klinik evre ve uzak metastaz ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Ek olarak sağkalım analizleri, düşük miR-564 ekspresyonuna sahip hastaların, yüksek miR-564 ekspresyonuna sahip olanlara göre daha kısa bir genel sağkalıma ve hastalıksız sağkalıma sahip olduğunu göstermiştir (Gao ve Xu, 2018). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin aksine Teng ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada sistemik lupus eritematoz hastalarında (SLE) diferansiyel olarak eksprese edilen miRNA ve hedef genlerini analiz etmek için biyoinformatik yöntemler kullanmışlar ve çalışmalarında miR-564'ün ekspresyon seviyesinin, monositlerin Mo-DC hücrelerine farklılaşması ve olgunlaşması sırasında artan bir eğilim gösterdiğini saptamışlardır (Teng vd. 2021).

Bu çalışmada araştırılan diğer bir miRNA olan miR-718'in de ekspresyon seviyesi kolorektal kanserli hastaların tümörlü dokularında sağlıklı dokularına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde azalmıştır. Benzer şekilde, 2014 yılında Leng ve arkadaşları yumurtalık kanserinde VEGF'nin regülasyonunda mikroRNA'nın (miRNA) rolünü araştırmıştır. Bu çalışmada Leng ve arkadaşları miR-718'in düşük seviyelerde eksprese edildiğini ve bu durumun yumurtalık kanseri örneklerinde görülen VEGF ekspresyonu ile ters orantılı olduğunu bulmuştur (Leng vd 2014). 2014 yılındaki bir başka çalışmada Xue ve arkadaşları miR-718 ekspresyonundaki inhibisyonunun, PTEN sentezini arttırdığını ve Nef ve K1 ile indüklenen anjiyogenez ve tümörigenezin sinerjistik etkisini bastırdığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, miR-718'in PTEN'i hedefleyerek, AKT/mTOR sinyal yolunun aktivasyonu ile Nef ve K1 kaynaklı anjiyogeneze aracılık ettiğini göstermiştir (Xue vd, 2014). Özofagus skuamöz hücreli karsinom (ESCC) hastalarında plazma miR-718'in ekspresyon düzeyini ve tanısal değerini araştırmak için 2016 yılında yapılan bir çalışmada, ESCC hastalarının plazma miR-718 ekspresyon seviyesinin, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde düşük olduğu gösterilmiştir (Sun vd, 2016). Başka bir

Çalışmada da Wang ve arkadaşları tarafından papiller tiroid kanseri örneklerinde miR-718 ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir (Wang vd.2018). Bizim alışmamızda elde edilen bulguların aksine Liu ve arkadaşları miR-718'in gatrik kanser proliferasyonu ve invazyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için MTT testi ve Transwell testi uygulamıştır. Sonuçlar düşük PTEN ekspresyonunun ve yüksek miR-718 ekspresyonunun, olumsuz prognoz ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermiştir ve her ikisi de gatrik kanserli hastaların daha kötü prognozunu öngören biyobelirteçler olarak tanımlanmıştır. Artan miR-718 ekspresyonunun, PTEN ekspresyonunu azaltabileceği, böylece PI3K/Akt sinyalini artırabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, miR-718 ile transfekte edilen mide hücrelerinin proliferasyon ve invazyon yeteneklerinin, kontrol miRNA ile transfekte edilenlere kıyasla önemli ölçüde arttığı görülmüştür.

Bu çalışmalarda ortaya çıkan farklı sonuçların sebepleri arasında, miRNA'ların farklı hedef mRNA'ları düzenlemeleri, farklı gen ve gen yolakları üzerinde değişken etkiler göstermeleri ve miRNA'ların karmaşık moleküler mekanizmaları yer almaktadır. Bizim yaptığımız bu çalışma ve benzer çalışmalar bu moleküler mekanizmaların anlaşılmalarına katkı sağlayacaktır.

BÖLÜM VI

SONUÇ VE ÖNERİLER

80 kolorektal kanser hastasından alınan tümörlü ve tümörün çevresindeki sağlıklı dokularda miR-564 ve miR-718 ekspresyon seviyelerinin karşılaştırıldığı bu tez çalışmasında;

- Hem miR-564'ün hem de miR-718'in ekspresyon seviyelerinin tümörlü dokularda, normal dokulara göre anlamlı derecede azalma gösterdikleri sonucuna ulaşılmıştır.
- Elde edilen veriler doğrultusunda hem miR-564 hem de miR-718'in kolorektal karsinogenez oluşumunda tümör baskılayıcı rol oynadığı, bu iki miRNA'nın kolorektal kanserde yeni birer biyobelirteç olabileceği sonucuna varılmaktadır.
- Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler, özellikle bu malignite için, malignite öncesi lezyonların yavaş gelişmesi nedeniyle, erken teşhis ve tedavilerle hastalık yükünün azaltılmasına yönelik bakış açıları adına umut vericidir.
- Bu çalışmamızın spektrumu genişletilerek miR-564 ve miR-718'in ekspresyon düzeylerinin yanı sıra dokulardaki protein düzeyleri ve sinyal yolları gibi parametrelerin de analiz edilmesi, bu iki miRNA'nın kolorektal kanserdeki rollerinin aydınlatılmasına yardım edecektir.
- Bu çalışma ve benzerleri, mikroRNA'ların rollerinin aydınlatılması ve kolorektal kanser gibi insan hayatını ciddi şekilde tehdit eden bir çok hastalıkla mücadelede yeni bakış açıları kazandıracaktır.

KAYNAKLAR

ACS. American Cancer Society. (2022). *American Cancer Society cancer.org* 1.800.227.2345 18.02.2022.

Arrington, A. K., Heinrich, E. L., Lee, W., Duldulao, M., Patel, S., Sanchez, J., Kim, J. (2012). Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **13(12)**, 12153–12168.

Attisano, L., & Tuen Lee-Hoeflich, S. (2001). *Genome Biology*, **2(8)**, reviews3010.1.
Aune, D., Chan, D. S. M., Lau, R.; Vieira, R., Greenwood, D. C., Kampman, E., Norat, T. (2011). Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ*, 343, d6617–d6617.

Bamford, S., Dawson, E., Forbes, S., Clements, J., Pettett, R., Dogan, A., Flanagan, Teague, Futreal, Stratton, Wooster, R. (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *British Journal of Cancer*, 91(2), **355–358**.

Sandra M. Bell, Nigel Scott, Debra Cross, Peter Sagar, Fraser A. Lewis, G. Eric Blair, Graham R. Taylor, Michael F. Dixon, and Philip Quirke (1993). Prognostic value of p53 overexpression and c-Ki-ras gene mutations in colorectal cancer. *Gastroenterology*, **104(1)**, 57–64.

Burt, R. (2007). Inheritance of colorectal cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(4), 293–300.

Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **23(1)**, 175–205.

Carethers, J. M. (1996). The Cellular and Molecular pathogenesis of Colorectal Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, **25(4)**, 737–754.

Chan, Doris S. M., Lau, Rosa; Aune, Dagfinn; Vieira, Rui, Greenwood, Darren C., Kampman, Ellen, Norat, Teresa; Tomé, Daniel (2011). Red and Processed Meat and Colorectal Cancer Incidence: *Meta-Analysis of Prospective Studies*. PLoS ONE, **6(6)**, e20456.

Chen, Y., & Stallings, R. L. (2007). Differential Patterns of MicroRNA Expression in Neuroblastoma Are Correlated with Prognosis, Differentiation, and Apoptosis. *Cancer Research*, **67(3)**, 976–983.

Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*, **10(10)**, 704–714.

Davis-Dusenbery, B. N., & Hata, A. (2010). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *The journal of biochemistry*, **148(4)**, 381-392.

W. De Roock, H. Piessevaux, J. De Schutter, M. Janssens, G. De Hertogh, N. Personeni, B. Biesmans, J., L. Van Laethem, M. Peeters, Y. Humblet, E. Van Cutsem & S. Tejpar (2007). KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Annals of Oncology*, **19(3)**, 508–515.

Deaton, C., Froelicher, E. S., Wu, L. H., Ho, C., Shishani, K., & Jaarsma, T. (2011). The Global Burden of Cardiovascular Disease. *European Journal of Cardiovascular Nursing*, **10**, S5–S13.

Diederichs, Sven; Winter, Julia; Jung, Stephanie; Keller, Sarina; Gregory, Richard I. (2009). Many roads to maturity: *microRNA biogenesis pathways and their regulation*., **11(3)**, 228–234.

Ding, Lei; Lan, Zhenwei, Xiong, Xianhui, Ao, Hongshun, Feng, Yingting, Gu, Huan, Yu, Min, Cui, Qinghua (2018). The Dual Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, **19(9)**, 2791.

Dong, Y., Wu, W., Wu, C. et al. MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: a clinical perspective. *Br J Cancer* **104**, 893–898 (2011).

Ergin K., Çetinkaya R. (2022) Regulation of MicroRNAs. In: Allmer J., Yousef M. miRNomics. *Methods in Molecular Biology*, vol 2257. Humana, New York, NY.

Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, **38(7)**, 867–871.

Gao, F., & Xu, F. (2018). Reduced expression of miR-564 is associated with worse prognosis in patients with osteosarcoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **22(18)**, 5851-5856.

Gebert, Luca F. R.; MacRae, Ian J. (2018). Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. Volume 71, Issue 3 p. **209-249**.

Guo, Yong; Qi, Yong; Guo, Aitao; Du, Chengxiong; Zhang, Rong; Chu, Xiaoyong (2017). miR-564 is downregulated in gastric carcinoma and targets E2F3. *Oncology Letters*.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, **15(8)**, 509-524.

Hannah Ritchie and Max Roser (2018) - "Causes of death". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/causes-of-death>' This article was first published in February 2018. Last updated in December 2019. [Online Resource].

Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, **20(8)**, 460–469.

Hong, S. N. (2018). Genetic and epigenetic alterations of colorectal cancer. *Intestinal Research*, **16(3)**, 327.

Hongbin Li, Nan Wang, Yuntian Xu, Xiao Chang, Jing Ke & Jun Yin (2022) Upregulating microRNA-373-3p promotes apoptosis and inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells, *Bioengineered*, 13:1, 1304-1319.

Hyuna Sung PhD, Jacques Ferlay MSc, ME, Rebecca L. Siegel MPH, Mathieu Laversanne MSc, Isabelle Soerjomataram MD, MSc, PhD, Ahmedin Jemal DMV, PhD, Freddie Bray BSc, MSc, PhD. (2021).

Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and Consequences of MicroRNA Dysregulation. *The Cancer Journal*, **18(3)**, 215–222.

Hu-Liang Jia, Qing-Hai Ye, Lun-Xiu Qin, Anuradha Budhu, Marshonna Forgues, Yidong Chen, Yin-Kun Liu, Hui-Chuan Sun, Lu Wang, Hong-Zhou Lu, Fang Shen, Zhao-You Tang, and Xin Wei Wang (2007). Gene Expression Profiling Reveals Potential Biomarkers of Human Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **13(4)**, 1133–1139.

Kalantari, P., Harandi, O. F., Agarwal, S., Rus, F., Kurt-Jones, E. A., Fitzgerald, K. A., Daniel R. Caffrey & Golenbock, D. T. (2017). miR-718 represses proinflammatory cytokine production through targeting phosphatase and tensin homolog (PTEN). *Journal of Biological Chemistry*, **292(14)**, 5634-5644.

Kenneth J. Livak; Thomas D. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, **25(4)**,–408.

Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.

Kube, D. M., Savci-Heijink, C. D., Lamblin, A.-F., Kosari, F., Vasmatazis, G., Cheville, J. C., Donald P. Conelly, Klee, G. G. (2007). Optimization of laser capture microdissection and RNA amplification for gene expression profiling of prostate cancer. *BMC Molecular Biology*, **8(1)**, 25.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. (1993) The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75:843–854.

Leng, R., Zha, L., & Tang, L. (2014). MiR-718 represses VEGF and inhibits ovarian cancer cell progression. *FEBS Letters*, **588(12)**, 2078–2086.

Liang, C., Xu, Y., Ge, H., Xing, B., Li, G., Li, G., & Wu, J. (2017). miR-564 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion by targeting the GRB2-ERK1/2-AKT axis. *Oncotarget*, **8(64)**, 107543.

- Liang, T., Hu, X.-Y., Li, Y.-H., Tian, B.-Q., Li, Z.-W., & Fu, Q. (2016). MicroRNA-21 Regulates the Proliferation, Differentiation, and Apoptosis of Human Renal Cell Carcinoma Cells by the mTOR-STAT3 Signaling Pathway. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, **24**(5), 371–380.
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., E. Pukkala, A., Skytthe, Hemminki, K. (2000). Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*, **343**(2), 78–85.
- Liu, B., Li, J., Cairns, M. J. (2014). Identifying miRNAs, targets and functions. *Briefings in Bioinformatics*, **15**(1), 1–19.
- Liu, S., Tian, Y., Zhu, C., Yang, X., & Sun, Q. (2018). High miR-718 Suppresses Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) Expression and Correlates to Unfavorable Prognosis in Gastric Cancer. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, **24**, 5840–5850.
- López-Casas, P. P., & López-Fernández, L. A. (2010). Gene-expression profiling in pancreatic cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **10**(5), 591–601.
- Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **141**(4), 1202–1207.
- Mariàngels de Planell-Saguer; María Celina Rodicio (2011). Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. **699**(2), 134–152.
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., & Rodriguez Yoldi, M. J. (2017). Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, **18**(1), 197.
- Medina, Pedro P.; Slack, Frank J. (2008). MicroRNAs and cancer: An overview. *Cell Cycle*, **7**(16), 2485–2492.
- Mehlen, P., & Fearon, E. R. (2004). Role of the Dependence Receptor DCC in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology*, **22**(16), 3420–3428.

- Meng, F. J., Meng, F. M., Wu, H. X., & Cao, X. F. (2017). miR-564 inhibited metastasis and proliferation of prostate cancer by targeting MLLT3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **21(21)**, 4828-4834.
- McCullough, et al. (2018). Circulating Vitamin D and Colorectal Cancer Risk: An International Pooling Project of 17 Cohorts. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*.
- Michlewski, G., & Cáceres, J. F. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *Rna*, **25(1)**, 1-16.
- Murphy, Neil, Moreno, Victor, Hughes, David J., Vodicka, Ludmila, Vodicka, Pavel, Aglago, Elom K., Gunter, Marc J., Jenab, Mazda (2019). Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility. *Molecular Aspects of Medicine*, S0098299719300330.
- Mousavi, S. M., Fallah, M., Sundquist, K., & Hemminki, K. (2011). Age- and time-dependent changes in cancer incidence among immigrants to Sweden: colorectal, lung, breast and prostate cancers. *International Journal of Cancer*, 131(2), E122–E128.
- Mutlu, Merve, Saatci, Özge, Ansari, Suhail A., Yurdusev, Emre; Shehwana, Huma, Konu, Özlen, Raza, Umar, Şahin, Özgür (2016). miR-564 acts as a dual inhibitor of PI3K and MAPK signaling networks and inhibits proliferation and invasion in breast cancer. *Scientific Reports*, **6(1)**, 32541.
- Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., & Vodicka, P. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, **27(2)**, 211–218.
- NCI. National Cancer Institute. (2021). What is cancer. NCI Intl.: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. 05.05.2021.
- Nguyen, H., & Duong, H. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology Letters*.
- Y. Ning; L. Wang; E. L. Giovannucci (2010). A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies, **11(1)**, 19–30.

O'Brien, Jacob, Hayder, Heyam, Zayed, Yara, Peng, Chun (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402.

Oyanagi, H., Shimada, Y., Nagahashi, M., Ichikawa, H., Tajima, Y., Abe, K., M. Nakano, H. Kameyama, Y. Takii, T. Kawasaki, Kei- Ichi Homma, Y. Ling, S. Okuda, K. Takabe Wakai, T. (2019). SMAD4 alteration associates with invasive-front pathological markers and poor prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*.

Petty, R. D., Samuel, L. M., Murray, G. I., MacDonald, G., O'Kelly, T., Loudon, M., Binnie N., Ally E., Mckinlay A., Wang W., Gilbert F., Semple S. Collie-Duguid, E. S. (2009). APRIL is a novel clinical chemo-resistance biomarker in colorectal adenocarcinoma identified by gene expression profiling. *BMC Cancer*, **9**(1).

Phelps, Reid A., Broadbent, Talmage J., Stafforini, Diana M., Jones, David A. (2009). New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer. *Cell Cycle*, **8**(16), 2549–2556.

Plotnikova O, Baranova A and Skoblov M. (2019). Comprehensive analysis of human microRNA-mRNA interactome. *Front. Genet.* 10:933.

Randrian, V., Evrard, C., Tougeron, D. Microsatellite Instability in Colorectal Cancers: Carcinogenesis, Neo-Antigens, Immuno-Resistance and Emerging Therapies. *Cancers* 2021, 13, 3063.

Rojas-Pirela M. et al. (2022). MicroRNAs: master regulators in host parasitic protist interactions. *Open Biol.* 12: 210395.

Rosa Visone, Carlo M. Croce (2009). MiRNAs and Cancer. **174**(4), 0–1138.

Rossi, M., Jahanzaib Anwar, M., Usman, A., Keshavarzian, A., & Bishehsari, F. (2018). Colorectal cancer and alcohol consumption populations to molecules. *Cancers*, **10**(2), 38.

Ru, Neng, Zhang, Fan, Liang, Jie, Du, Yuanli, Wu, Weifei, Wang, Feifan, Liu, Xinzong (2017). MiR-564 is down-regulated in osteosarcoma and inhibits the proliferation of osteosarcoma cells via targeting Akt. *Gene*, (), S0378111917310818.

Sadegh Babashah, Masoud Soleimani (2011). The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis., **47(8)**, 0–1137.

Saif, M. W., & Chu, E. (2010). Biology of Colorectal Cancer. *The Cancer Journal*, **16(3)**, 196–201.

Sanghamitra Bandyopadhyay, Ramkrishna Mitra, Ujjwal Maulik, Michael Q Zhang (2010). Development of the human cancer microRNA network., **1(1)**, 6.

Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical interventions in aging*, **11**, 967.

Siomi, H., & Siomi, M. C. (2010). Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Molecular cell*, **38(3)**, 323–332.

Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., Hogendorf, P. miRNAs in Cancer (Review of Literature). *Int. J. Mol. Sci.* 2022, **23**, 2805.

Sun, L., Dong, S., Dong, C., Sun, K., Meng, W., Lv, P., H. Yin, L. Ming, & He, F. (2016). Predictive value of plasma miRNA-718 for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomarkers*, **16(2)**, 265–273.

Sun, X., Zhang, P., Zhang, L., Zhao, J., & Zhou, L. (2018). MicroRNA-564 promotes the differentiation and proliferation of synovial mesenchymal stem cells into chondrocytes by targeting transforming growth factor beta 1. *Translational Surgery*, **3(1)**, 6–6.

Svoronos, A. A., Engelman, D. M., Slack, F. J. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Research*, 0008-5472.CAN-16-0359.

Sylvia K. Shenouda; Suresh K. Alahari (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor, **28(3-4)**, 369–378.

Tan, E.-H., Ramlau, R., Pluzanska, A., Kuo, H.-P., Reck, M., Milanowski, J. S-K Au, E. Felip, S. Orlov, M. Akimov, P. Delmar, L. Essioux, C. Hillenbach, B. Klughammer, P. Mcloughlin, Baselga, J. (2010). A multicentre phase II gene expression profiling study of putative relationships between tumour biomarkers and clinical response with erlotinib in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, **21(2)**, 217–222.

Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*, **11(1)**, 164.

Tieng, F.Y.F., Abu, N., Lee, L.-H., Ab Mutalib, N.-S. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer Liquid Biopsy. Current Updates on Its Potential in Non-Invasive Detection, Prognosis and as a Predictive Marker. *Diagnostics* 2021, **11**, 544.

Thorning, Tanja Kongerslev, Raben, Anne, Tholstrup, Tine, Soedamah-Muthu, Sabita S., Givens, Ian, Astrup, Arne (2016). Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food & Nutrition Research*, **60(1)**, 32527.

Venugopal, A., & Carethers, J. M. (2022). Epidemiology and biology of early onset colorectal cancer. *EXCLI Journal*, **21**, 162-182.

Wang, Xiuyan, Qi, Ming (2018). miR-718 is involved in malignancy of papillary thyroid cancer through repression of PDPK1. *Pathology - Research and Practice*, S0344033818308045.

Wang, Y., & Lee, C. G. L. (2008). MicroRNA and cancer - focus on apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13(1)**, 12–23.

Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Scientific American*, **275(3)**, 62-70.

Xue, M., Yao, S., Hu, M., Li, W., Hao, T., Zhou, F., D, Qin, J, Zhu, Gao, Q, Yan, & Lu, C. (2014). HIV-1 Nef and KSHV oncogene K1 synergistically promote angiogenesis by inducing cellular miR-718 to regulate the PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Nucleic acids research*, 42(15), 9862-9879.

Yang, Bin, Jia, Lin, Guo, Qiaojuan; Ren, Hui; Hu, Desheng; Zhou, Xiaoyi, Ren, Qingrong, Hu, Yanping; Xie, Tao (2015). MiR-564 functions as a tumor suppressor in human lung cancer by targeting ZIC3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **467(4)**, 690–696.

Yang, L., Belaguli, N., & Berger, D. H. (2009). MicroRNA and Colorectal Cancer. *World Journal of Surgery*, **33(4)**, 638–646.

Yimei Cai, Xiaomin Yu, Songnian Hu, Jun Yu (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. **7(4)**, 154.

Zhang, Q., Yin, X., & Zhang, Y. (2020). MicroRNA-221 Promotes Cell Proliferation and Inhibits Apoptosis in Osteosarcoma Cells by Directly Targeting FBXW11 and Regulating Wnt Signaling. *Archives of Medical Research*.

Zhong, Yuchuan; Li, Yan; Song, Tao; Zhang, Dapeng (2019). MiR-718 mediates the indirect interaction between lncRNA SEMA3B-AS1 and PTEN to regulate the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Physiological Genomics*, physiolgenomics.00019.2019.

Zhou, K., Liu, M., & Cao, Y. (2017). New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene–microRNA–Tumor Suppressor Gene Network. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4.

Ziyue Teng, Xiaoying Lin, Chunyan Luan, Yixuan Sun, Xiaolan Li (2021). The high expression of miR-564 in patients with systemic lupus erythematosus promotes differentiation and maturation of DC cells by negatively regulating TP53 expression in vitro. *Lupus*.

ÖZGEÇMİŞ (CV)

Kişisel Bilgiler

Ad ve Soyad: Erkan ELİHAN

Eğitim Bilgileri

2020-2022 Yüksek Lisans Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri

Enstitüsü Biyoloji

Tez Başlığı: Kolorektal Kanserli Hastaların Dokularında miR-564 ve miR-718'in Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Türkan GÜRER

2009-2014: Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji

Uluslararası Yayınlar ve Bildiriler

1.Araştırmacı Erkan Elihan- Dr. Öğretim Üyesi Deniz mihçioğlu - Dr. Öğretim Üyesi Türkan Gürer - Dr. Öğretim Üyesi Alper Aytekin (2022). Kolorektal Kanserde Mir-564 ve Mir-718 Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması. Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi (UBCAK). 9th International Academic Studies Conference 03-04-05 Ağustos 2022 (Sözlü Sunum).