



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GENÇ YAŞ KOLOREKTAL KANSERLERDE TÜMÖR GELİŞİM SÜRECİNDE
miRNA' LARIN ÖNEMİ**

Seçil AK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Bursa-2013



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GENÇ YAŞ KOLOREKTAL KANSERLERDE TÜMÖR GELİŞİM SÜRECİNDE miRNA'
LARIN ÖNEMİ

Seçil AK

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Berrin TUNCA

Bursa-2013

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	III
SUMMARY.....	IV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kolorektal Kanseri.....	3
2.2. Kolorektal Kanseri Tanı ve Tedavisinde Kullanılan Histopatolojik Evreleme Sistemleri.....	4
2.3. Kolorektal Kanseri Oluşumunda Etkili Olan Genetik ve Epigenetik Mekanizmalar.....	6
2.3.1. Genetik Değişimler.....	7
2.3.1.1. Kromozomal Kararsızlık (CIN) Yolu.....	7
2.3.1.1.1. Beşinci Kromozomdaki Delesyonlar.....	8
2.3.1.1.2. Onyedinci Kromozomdaki Delesyonlar.....	8
2.3.1.1.3. Onsekizinci Kromozomdaki Delesyonlar.....	9
2.3.1.1.4. <i>KRAS</i> ve <i>BRAF</i> Genlerindeki Mutasyonlar.....	10
2.3.1.2. Mikrosatellit Kararsızlık (MSI) Yolu.....	11
2.3.1.3. Gen Ekspresyon Değişimleri.....	12
2.3.2. Epigenetik Değişimler.....	12
2.3.2.1. CpG Adalarında Meydana Gelen Metilasyon Mekanizmaları (CIMP).....	12
2.3.2.2. miRNA' lar.....	13
2.3.2.2.1. miRNA' ların Yapısı ve Biyogenezi.....	13
2.3.2.2.2. miRNA' ların Kansereleşme Sürecindeki Rollerini.....	14
2.3.2.2.3. Kolorektal Kanserde Rol Oynayan miRNA' lar.....	17
2.3.2.2.4. Kolorektal Kanseri Oluşumunda Etkili Olan Sinyal Yollarında miRNA' ların Rolü.....	20
2.3.2.2.4.1. WNT/ β -katenin Sinyal Yoluğında miRNA' ların Rolü.....	21
2.3.2.2.4.2. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü) Sinyal Yoluğında miRNA' ların Rolü.....	23
2.3.2.2.4.3. <i>P53</i> Yoluğında miRNA' ların Rolü.....	24
2.3.2.2.4.4. Hücre Dışı Matrisin Bozulması ve Epitel Hücreden Mezenşimal Hücreye Geçişte miRNA' ların Rolü.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	
3.1. Hasta Grubu ve Klinik Özellikler.....	27
3.2. Gereçler.....	29
3.2.1. Kullanılan Aletler.....	29
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	30
3.3. Yöntemler.....	30
3.3.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi.....	30
3.3.2. Elde Edilen RNA' ların Miktar ve Kalite Tayini.....	30
3.3.3. RNA' lardan cDNA Sentezi.....	32
3.3.4. Real-Time PCR ile miRNA Ekspresyon Analizleri.....	33
3.4. İstatistiksel Analiz.....	38

4. BULGULAR.....	40
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	51
6. KAYNAKLAR.....	58
7. TEŞEKKÜR.....	66
8. ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÖZET

Kolorektal kanser, dünyada en yaygın görülen kanserlerden biridir. Klinik ve patolojik gelişmelere rağmen kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılan belirteçler sınırlı kalmaktadır (1). Son yıllarda mikroRNA' ların işlevlerinin ve kanser gelişimindeki rollerinin anlaşılmasına başlanması, hem kanserin moleküler patolojisinin anlaşılmasında hem de yeni moleküler hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesinde umut oluşturmuştur.

Çalışmada, Türk popülasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan, 50 yaş altında kolorektal kanser tanısı almış bireylerin tümör dokularında, kolorektal kanser sürecinde etkili olabileceği düşünülen 38 farklı miRNA' nın ekspresyon profilleri incelendi. Elde edilen veriler, web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak değerlendirildi. Değerlendirilen hasta grubunun tümör dokuları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, miR-143' ün ekspresyon seviyesinde anlamlı düşüş gözlemlendi ($p=0.01$). Aynı zamanda miR-143 ekspresyon seviyesinin nüks ve uzak metastaz varlığında da düşüş gösterdiği belirlendi. Normal doku ile karşılaştırıldığında, evre 4 tümör dokularında, miR-106a ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı artış belirlendi ($p=0.02$). Bu ekspresyon artışının lenf nodu metastazı varlığında da anlamlı olduğu gözlemlendi ($p=0.03$).

Elde edilen bulgular ışığında; Türk popülasyonuna ait, kötü prognoz potansiyeli olan, erken yaşta tanı almış ve aile hikayesi olmayan hastaların tümör dokularında, miR-106a ve miR-143 ekspresyon düzeyleri değerlendirilerek tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi edinilebileceği düşünülmektedir. Mevcut bulgular, bu hastaların tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesine katkı oluşturarak hastalara ait yaşam süresinin ve kalitesinin iyileştirilmesine imkan sağlayacaktır. Ayrıca elde edilen bulguların Türk popülasyonuna ait bu hastalarda, kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kolorektal kanser, mikroRNA, genç yaş, RT-PCR.

SUMMARY

Colorectal cancer is the type of cancer most frequently seen in the world. Despite clinic and pathologic improvements, markers used in diagnosis and treatment of colorectal cancer are still not enough (1). Recently understanding the functions of miRNAs and their roles in cancer progression has been providing expectations for understanding the molecular pathology of breast cancer and developing new molecular targeted therapies.

In this study, 38 different miRNAs expression profiles which thought to have effects on colorectal cancer are investigated. Expression profiles of these miRNAs were evaluated for non-familial and early-onset colorectal tumor and non-tumor tissues of Turkish patients. Data, gathered from study, evaluated by web based Sabiosciences PCR-Data Analyze (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5). Expression levels of miR-143 is significantly reduced in tumor samples with respect to normal tissues ($p=0.01$). miR-143 expression is also correlated with the recurrence and distant metastasis. However, expression levels of miR-106a is significantly increased in tumor tissues ($p=0.02$). This incensement is also correlated with the presence of lymph node metastasis ($p= 0.03$).

These data will be beneficial for evaluation of miR-106a and miR-143 expression levels to obtain information about aggressiveness of tumor and metastasis risk in early onset, non-familial colorectal cancer patients. In addition, these results will contribute similar therapy approaches in other colorectal cancer patients, thus, patient's survival rates and quality of their life may be improved. Moreover, our findings will be useful for the determination of biomarkers on the follow-up of poor prognosis in Turkish colorectal cancer patients with early-onset that could contribute to the international and national literature.

Key words: Colorectal Cancer, microRNA, early onset, RT-PCR

1. GİRİŞ

Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında, protein kodlamayan küçük RNA molekülleri olan miRNA (mikroRNA)'lar tanımlanmıştır (1). Ökaryotik hücrelerde bulunup, protein kodlamayan ve gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görev alan yaklaşık 22 nükleotid büyüklüğündeki bu moleküller miRNA olarak tanımlanmaktadır. miRNA' lar, mRNA' nın 3' kodlama yapmayan bölgesinde (3' UTR) baz eşleşmesi yaparak bu bölgede bulunan transkriptlerin translasyonunu baskılamaktadırlar (2,3). miRNA' lar bu şekilde görev yaparak gen düzenlenmesine etki etmektedirler. Bu düzenlenmenin çeşitli mekanizmalarla bozulması hastalıklara ve kanser oluşumlarına sebep olmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda kanserde miRNA ekspresyon profilleri değerlendirilmiş olup, bazı miRNA' ların ekspresyonlarının azaldığı bazılarının ise arttığı belirlenmiştir (2-4). Birçok kanser türünde bu çalışmaların tekrarlanması ve fonksiyonel analizler sonucu, ekspresyonu azalan miRNA' ların “tümör baskılayıcı” özellik göstererek genelde onkogenlerin transkriptlerini hedeflediği, ekspresyonu artan miRNA' ların ise “onkogenik” özellik göstererek, tümör baskılayıcı genlerin transkriptlerini hedeflediği sonucuna varılmıştır (5). Başta meme, akciğer ve kolorektal olmak üzere çeşitli kanserde tüm genom incelenmiş ve birçok miRNA' nın bu şekilde, tümör baskılayıcı ya da onkogenik özellik göstererek tümör oluşumunda görev aldıkları kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile birçok kanserde tümör oluşumuna sebep olan miRNA' ların ekspresyon profilleri incelenmektedir. Detaylı araştırmalar sonucunda, tanımlanan miRNA ekspresyon profillerinin, yaşa, tümör alt tiplerine ve popülasyonlara göre farklılık gösterdiği görülmektedir (6-8).

Ülkemizde sıklıkla karşılaşılan ve ölümlere neden olan Kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilecek biyobelirteçler yetersiz kalmaktadır. Son beş yılda elde edilen bulgular sonucunda, mir-21, mir-145, mir-143, let-7a, mir-155 başta olmak üzere yaklaşık 300 adet miRNA' nın kolorektal kanser tümör oluşumunda etkili olduğu saptanmıştır (9, 10). Ancak kolorektal kanser gelişiminde etkisi olduğu bilinen bu miRNA' ların Türk popülasyonundaki ekspresyon seviyeleri bilinmemektedir. Bu amaçla planlanan çalışmada, Türk popülasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan genç yaşta kolorektal kanser tanısı almış bireylerin tümör dokularında, kolorektal kanser gelişim sürecinde etkili olduğu belirlenen 38 farklı miRNA' nın ekspresyon profilleri değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda, bu popülasyona özgü hastalara ait tümörlerde, değerlendirilen farklı miRNA' lar arasından miR-17, miR-145, miR-143, miR-125b ve miR-106a ekspresyon seviyelerinde farklılıklar gözlemlendi. Çalışmanın sonucunda, miR-106a' nın ekspresyon seviyesindeki artışın ve miR-

143' ün ekspresyon seviyelerindeki azalmanın tümörün metastatik potansiyeli hakkında bilgi verebilecek moleküler belirteçler olabilecekleri önerildi.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanserler tüm dünyada en sık görülen kanserler arasında yer almakta olup kansere bağlı ölümlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Akciğer, meme ve prostat kanserlerinden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (1). Gastrointestinal sistem kanserleri içerisinde değerlendirilen kolorektal kanser, erkek ve kadınlarda görülen tümörlerin %15' ini oluşturmaktadır. Dünya sağlık örgütü kayıtlarına göre, her yıl teşhis edilen yeni vaka sayısı yaklaşık 800.000' dir. Bununla birlikte kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10' nu kolorektal kanser nedeniyle meydana gelmektedir (2).

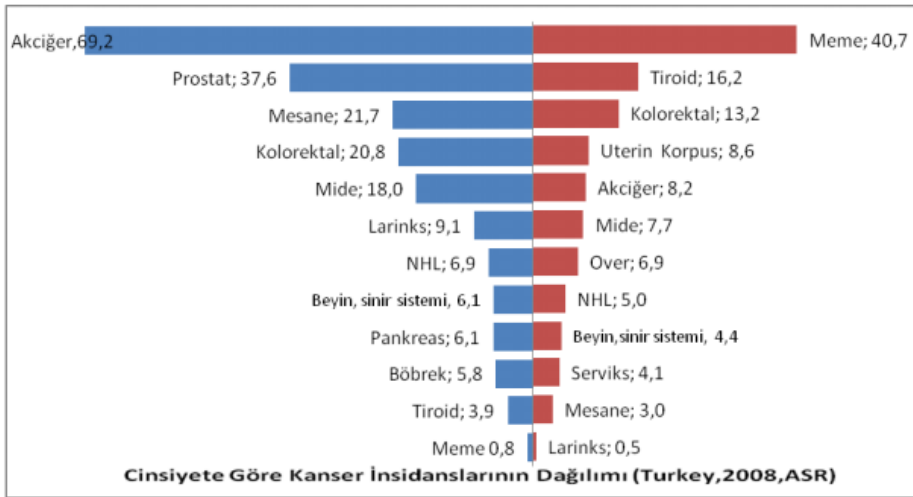
Kolorektal kanser tümörleri kalın bağırsakta meydana gelmektedir. Kalın bağırsağın son 15 cm' lik kısmına rektum, kalan kısmına ise kolon adı verilmektedir. Kolonda ve rektumda meydana gelen tümörlerin risk faktörleri, oluşum sebepleri ve tedavileri aynı olduğu için birlikte anılmakta ve kolorektal tümörler olarak tanımlanmaktadır. Bu tümörler bağırsağın iç kısmında, genellikle polip ismi verilen yapılar şeklinde meydana gelmektedir (10). Hastalığa ait belirtiler çoğunlukla polip oluşumundan sonra başlamaktadır. Rektumdan kan gelmesi, gaitanın kanla bulaşık olması, tuvalete çıkma alışkanlıklarında değişiklikler meydana gelmesi, gaitanın incilmesi, kabızlık ya da ishal durumlarının ortaya çıkması, sık sık tuvalete gitme isteği, karında gaz ağrıları, anemi ve kilo kaybı kolorektal kanserin başlıca belirtileri olmakla beraber bu hastalığa spesifik değildirler (11, 12).

Kolorektal kanser geniş bir coğrafik alanda gözlenmektedir. Kanserin görülme oranı, Kuzey Amerika, Avrupa ve Avustralya gibi gelişmiş bölgelerde; Afrika, Güney ve Doğu Asya' yı içine alan orta ve düşük gelirli diğer bölgelere oranla daha yüksektir. Bu durum, beslenme alışkanlıkları ile birlikte endüstrileşmiş modern yaşamın gelişmesine bağlanmaktadır. Kolon kanseri ve rektal kanserinin görülme sıklığı genelde paralellik göstermekle birlikte coğrafi farklılık kolon kanserinde daha belirgindir. Kuzey Amerika gibi yüksek riskli bölgelerde kolon kanseri rektal kansere göre iki kat daha sık görülmektedir. Kolorektal kanser görülme sıklığı aynı ülke içinde de yörelere ve topluluklara göre değişim göstermektedir. Bu farklılık diyet ve çevresel faktörlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Yaş, aile hikayesi, diyet, sigara, aşırı alkol tüketimi, az fiziksel hareket kolorektal kanser tümörlerinin oluşumunda etkili olan başlıca risk faktörleridir. 45-50 yaş üzeri kişilerde, anne, baba, kardeş gibi yakın aile bireylerinde kolorektal tümör veya polip olanlarda, rahim, yumurtalık ya da meme kanseri olan kadınlarda, ülseratif kolit veya Crohn

gibi hastalıklara sahip bireylerde risk üç kata kadar çıkmaktadır (11-13). 50 yaş altı tanı almış bireylerin birinci derece yakınlarında ise risk altı kat artmaktadır (14).

Kolorektal kanser sporadik ya da ailesel olarak gelişmektedir. Kalıtsal olarak meydana gelen kolorektal tümörlerin gelişiminde, Ailesel adenomatöz poliposiz (FAP), Atenüe ailesel poliposiz (AFAP) (14, 15), Lynch sendromu (HNPCC) (14, 16), MYH ile ilişkili poliposiz (MAP) ve Hiperplaztik poliposiz gibi sendromlar rol oynamaktadır. Bu sendromlar tüm kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %15' ini oluşturmaktadır, bu kansere ait tümörlerin büyük çoğunluğu (% 80-90) sporadik olarak meydana gelmektedir (17).

Kolorektal kanser Türkiye' de de en yaygın görülen kanserlerden biri olup tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır (Şeik-1).



Şekil-1 Türkiye'de Cinsiyete Göre Kanser İnsidanslarının Dağılımı (15)

Kolorektal tümörler birçok toplumda geç yaşta oluşmaktadır ve tanı konma yaşı ortalama 60'dır. Ancak ülkemizde sporadik olarak gelişen kolorektal tümörlerin 50 yaş altında görülme oranı diğer toplumlara göre çok daha yüksektir (18). 50 yaş altı hastalarda gelişen kolorektal kanserler genellikle daha ileri evrelerde tespit edilirler, musinöz komponent oranı daha yüksektir ve daha kötü prognoz göstermektedirler.

2.2. Kolorektal Kanser Tanı ve Tedavisinde Kullanılan Histopatolojik Evreleme Sistemleri

Son dönemde, birçok kanserin tanı ve tedavi protokollerinin şekillendirilmesinde kullanılabilecek yeni klinik yöntemler ve patolojik sınıflandırmalar bulunmuştur. Gastrointestinal sistem içerisinde moleküler tanı ile ilişkili klinik testlerin büyük bir bölümü kolorektal kanserlerde kullanılabilmekte ancak kesin tanıda esas olarak histopatolojik bulgulardan yararlanılmaktadır. Bu amaçla günümüze kadar, Dukes, Astler Coller ve Tümör-

lenf nodu-metastaz (TNM) olmak üzere üç farklı evreleme sistemi geliştirilmiştir (19). Dukes sınıflaması 1932’de, bir patolog olan Dukes tarafından oluşturulup, yirminci yüzyılın ikinci yarısında standart sınıflandırma olarak kullanılmıştır. Bu sınıflandırma rektal kanser için geliştirilmiş olmasına rağmen kolon kanseri evrelendirilmesinde de yararlanılmıştır. Dukes sistemi, tümör, bağırsak duvarında sınırlı kalmakta ise Evre A, tümör bağırsak duvarını penetre etmekteyse Evre B ya da lenf düğümü metastaz varlığı görülmekteyse evre C şeklinde tanımlanmaktadır. Daha sonra çeşitli eklemeler ile Dukes sınıflandırılması değiştirilmiştir. Değiştirilen sistemde hücrelerin yerleşiminden çok farklılaşan hücre sayısı önemli hale gelmiştir. Yeni Dukes yaklaşımı üç grade içermektedir (G1-G3). G1, çok farklılaşmış tübüller ile az nükleer polymorfizmi ve mitozu, G3 pleomorfik hücre yapısı ve yüksek insidanslı mitozu ifade etmektedir. G2 ise G1 ve G3 arasındaki evreyi oluşturmaktadır. Astler Coller sınıflandırması, Dukes sınıflamasının modifikasyonu ile yapılmış ve A’ dan D’ ye kategorize edilmiştir (14) A, mukozada sınırlı tümörü, B1, lenf nodu metastazı olmadan muskularis propriaya kadar tümör tutulumunu, B2, lenf nodu metastazı olmadan bağırsak duvarını aşan tümör tutulumunu, C1, bağırsak duvarını aşmamış tümör ile beraber lenf nodu metastazını, C2, bağırsak duvarını aşmış tümör ile beraber lenf nodu metastazını ve D, Uzak organ metastazını göstermektedir. Günümüzde kullanılmakta olan sınıflandırma sistemi ise Amerika Birleşik Kanser Komitesi (AJCC) tarafından 1987’de geliştirilen ve Uluslar arası Kanser Birliği (UICC) tarafından onaylanan Tümör-lenf Nodu-Metastaz (TNM) sistemidir. TNM sistemi, bağırsak duvarındaki invazyon derinliğine, bölgesel lenf nodu dağılımına ve uzak organ metastazı mevcudiyetine göre tanımlanmaktadır. İnvazyon derinliği T ile tanımlanmaktadır ve T1’ den T4’ e doğru artmaktadır. N, lenf nodu metastazını, M ise uzak organda görülen metastazı ifade etmektedir. Bu sistem günümüzde kolorektal kanserde en yaygın kullanılan patolojik sınıflandırma yöntemidir (20-22) (Tablo-1).

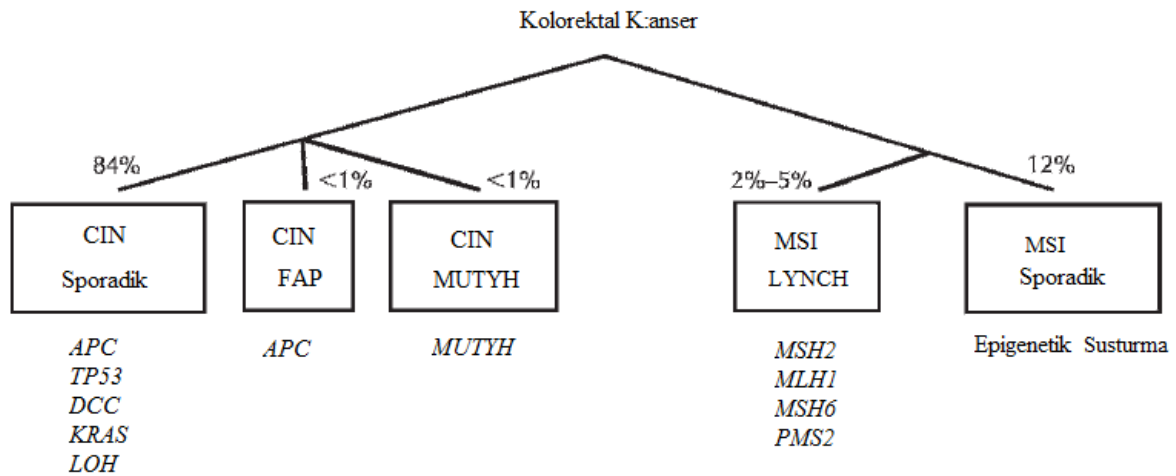
Tablo-1 Kolorektal Kanser Tanı ve Tedavisinde En Yaygın Kullanılan TNM Sistemi

Evre	TNM
0	T0N0M0
I	T1N0M0, T2N0M0
II	T3N0M0, T1-4N0M0
III	T1-4N1M0, T4N2M0
IV	TNM+

2.3. Kolorektal Kanser Oluşumunda Etkili Olan Genetik ve Epigenetik Mekanizmalar

Kolorektal kanser karmaşık bir sürece sahip olup, normal dokuda büyüme kontrol eden moleküler mekanizmaların bozulmasına yol açan bir seri genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucunda meydana gelmektedir (23). Değişimlerin birikimi sonucunda normal bir hücre kademeli olarak premalign, malign ve son olarak da metastatik tümöre dönüşmektedir (24). Bu süreçte, kanser yavaş ilerlemekte, bu hastalığa ait spesifik belirtilerde gözlenmemektedir. Bu nedenle, kolorektal kanser hastalarının %25-30' unda tanı sırasında karaciğer, akciğer, böbrek üstü bezleri, meme ve over gibi organlara uzak metastaz gelişimi görülebilmektedir (25).

Karsinogenezde (kansere oluşumunda) ilk değişiklikler, hücre büyümesi ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) arasındaki normal dengeyi etkileyen ve histopatolojik incelemelerle tespit edilemeyen moleküler olaylardır. Kanser oluşumundaki bu değişimler onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamir genlerinde meydana gelen delesyonlar, insersiyonlar ya da mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır (19,20). Kolorektal kanserin moleküler mekanizmasının araştırıldığı ilk çalışmalarda, bağırsak tabanındaki bir epitel hücrenin neoplazik sürece girmesine neden olan genetik değişimler temelde birbirinden farklı olan iki mekanizma ile açıklanmıştır (24, 25). Bu mekanizmalar, allelik kayıplar ve anöploidi ile karakterize olan kromozomal kararsızlıklar (genomic instability) ve bazı karmaşık DNA mutasyonları ve diploidinin artması ile kendisini gösteren değişiklikler (Microsatellite instability-MSI) şeklindedir (26) (Şekil-2).

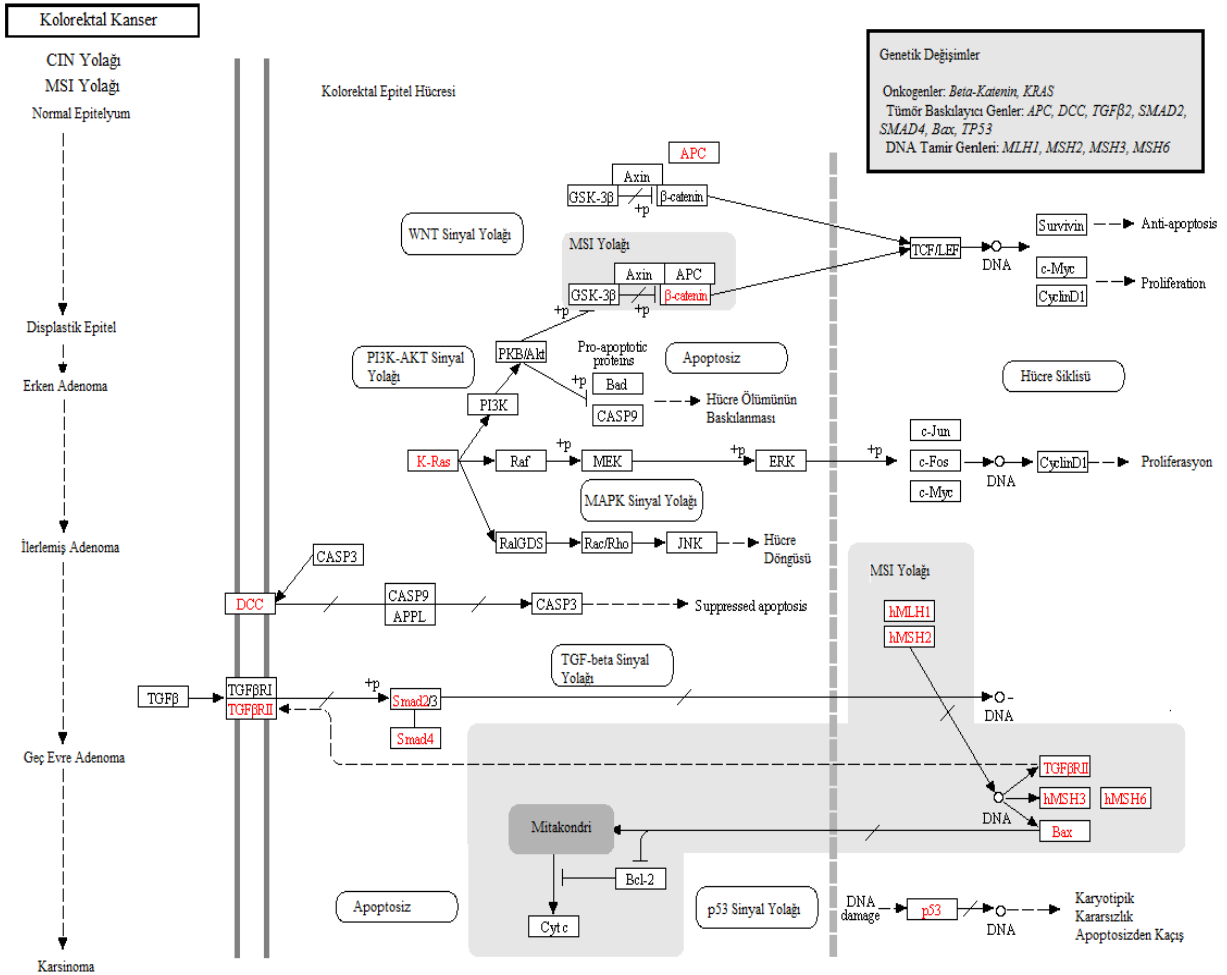


Şekil-2 Kolorektal Kanser Oluşumunda Etkili Olan CIN ve MSI Mekanizmalarının Görülme Oranları (2)

Daha sonraki dönemde yapılan çalışmalar ise kolorektal kanser oluşumunun daha karmaşık bir süreç içerdiğini ve normal epitel doku hücrelerinin tümörlü hücreye dönüşümüne neden olan genetik ya da epigenetik değişimlerin, kromozomal instabilite (CIN), MSI ve kolorektal tümör oluşumunda etkili olan belirli genlerdeki CpG adalarında metilasyonu olmak üzere üç farklı mekanizma ile meydana geldiğini ortaya koymuştur (27).

2.3.1. Genetik Değişimler

Kolorektal kanser oluşum sürecinde gözlenen genetik değişimler CIN ve MSI mekanizmaları ile meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar, β -katenin, KRAS gibi onkogenlerin aktivasyonu, APC, DCC gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve MLH1, MSH2 gibi DNA tamir genlerindeki bozulmalar sonucunda oluşmaktadır (Şekil-3).



Şekil-3 Kolorektal Kanser Oluşumunda Meydana Gelen Genetik Değişimler (28)

Ancak son dönemde yapılan array çalışmaları ile genlerde meydana gelen yapısal değişimlerin yanı sıra gen ekspresyon profillerinde de farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

2.3.1.1. Kromozomal Kararsızlık (CIN) Yolağı

Sporadik kökenli kolorektal tümörlerin büyük bir kısmı kromozomal kararsızlık (CIN) sonucunda oluşmaktadır (27). Bu tümörlerde sitogenetik, moleküler sitogenetik ve flow cytometric olarak tanımlanabilen çeşitli kromozomal değişiklikler ve çoklu yapısal aberasyonlar gözlenmektedir. CIN kökenli kolorektal tümörlerin büyük bir kısmında, *APC*, *DCC* ve *TP53* gibi tümör baskılayıcı genlerin kaybı ile bazı onkogenlerin aktivasyonu tümör gelişiminde rol oynamaktadır (28). CIN tümörlerinde etkili sinyal yolları, 5q, 18q ve 17p kromozomal kayıpları ile *KRAS* ve *BRAF* genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda aktive olmaktadır (29, 30).

2.3.1.1.1. Beşinci Kromozomdaki Delesyonlar

Kolorektal kanserlerde gözlenen 5. Kromozomun uzun kolunda meydana gelen delesyonlar ile *APC* geni kayba uğramaktadır (31, 32). Tümör baskılayıcı özellik gösteren *APC* geni, 2483 aminoasitten oluşan ve β -katenin, glikojen sentez kinaz 3β ve Bub kinaz gibi çeşitli proteinlerle etkileşerek birçok biyolojik süreçte görev alan bir protein kodlamaktadır (26). *APC* geninin kodladığı bu sitoplazmik protein, etkisini, aralarında *cMYC* onkogeninin de bulunduğu, kanser sürecinde etkili olan bazı önemli genlerin transkripsiyonunu aktive eden β -katenin üzerinden göstermektedir (29). Hücre proliferasyonunun gerekli olmadığı durumlarda, *APC* gen ürünü sitoplazmadaki serbest β -kateninin fosforilasyonunu uyarmakta ve degrade olmasını sağlamaktadır (28, 29). *APC* yokluğunda sitoplazmada serbest β -katenin miktarı artmakta ve nükleusa geçerek hücre çoğalmasında rol oynayan *MYC* gibi genlerin transkripsiyonunu aktive etmektedir (31).

APC geni sporadik kolorektal kanser oluşumunda önemli rol oynamaktadır (32). Bu gende meydana gelen somatik mutasyonlar, adeno-karsinoma sürecini başlatan en önemli genetik olaylardır (30). Aynı zamanda *APC*' de meydana gelen kalıtsal tipteki mutasyonlar sonucunda otozomal dominant geçişli, bağırsak tabanında binlerce polip ile karakterize edilen, FAP sendromu meydana gelmektedir (32-37).

2.3.1.1.2. Onyedinci Kromozomdaki Delesyonlar

Kolorektal kanser oluşunda meydana gelen genetik olaylardan bir diğeri 17. kromozomun delesyonlarıdır. 17. kromozomun kısa kolunda *TP53* lokalizedir. Bu gen tümör baskılayıcı özelliğe sahiptir (38).

Hücre, DNA hasarı gibi bir durumla karşılaştığında bu hasar çok çeşitli mekanizmalarla giderilmeye çalışılmaktadır. DNA hasarı söz konusu olduğunda *TP53* tümör baskılayıcı gen

ürünü olan p53 aktive edilmekte ve bu da hücre siklus inhibisyonu, apoptozis, DNA tamiri ve yaşlanmayı içeren antiproliferatif bir etkiye neden olmaktadır (39).

Bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan p53 (39), DNA hasarı, hipoksi, viral transformasyon, onkogen aktivasyonu, iğ hasarı, nükleotid düzensizliği gibi hücrede meydana gelen bir çok bozukluk sonrası aktive edilerek hasarlı hücrenin proliferatif yayılımını engelleyecek olan gen ekspresyon programını başlatmaktadır. Böylece organizmayı kanser gelişimine karşı korumaktadır.

TP53 mutasyonlarına kolorektal kanserin geç evrelerinde rastlanılmaktadır. Bu gende meydana gelen değişimlerin belirlenip prognostik bir belirteç olarak kullanılması hala tartışma konusudur (39, 40).

2.3.1.1.3. Onsekizinci Kromozomdaki Delesyonlar

18. kromozomun uzun kolunda meydana gelen kolorektal kanserlerin yaklaşık %60' ında gözlenmektedir. *DCC* (Deleted in colorectal carcinogenesis) bir tümör baskılayıcı genidir ve 18. Kromozomun uzun kolunda lokalizedir (18q21). Bu genin delesyonu kolorektal kanserlerin %70' inde ve ileri derecede displazi gösteren adenomların da yaklaşık olarak yarısında saptanırken hafif displazi gösteren adenomlarda görülmemektedir. Kolorektal kanser vakalarının çoğunda *DCC* ekspresyonu çok azalmıştır ve bu düşük ekspresyon seviyesi metastaz ve kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. *DCC* geni normal kolon mukozasında da varlığı gözlenen ve hücre adezyon moleküllerine benzer bir yapı gösteren bir proteinin sentezini düzenlemektedir. Adezyon molekülüne benzer bu protein sentezlenemediğinde hücreler arası etkileşimin neoplazik transformasyonla sonuçlanacak yönde değiştiği düşünülmektedir. *DCC* gen kayıpları özellikle apoptotik yolda önem taşımaktadır (41, 42).

DCC genindeki delesyonların varlığı 2. ve 3. evredeki kolorektal kanserlerde kötü prognozun oldukça kuvvetli bir belirleyicisidir. 18q alel kaybı sonucu olarak *DCC* kaybı daha fazla kemoterapi direnci ile sonuçlanan apoptoz bozukluğuna neden olması beklenir. Yapılan çalışmalar, 18q alel kaybının hastaliksız ve genel sağ kalımda önemli bir prognostik faktör olabileceğini göstermektedir (42, 43).

18. kromozomda yerleşim gösteren ve tümör baskılayıcı genler olan *DPC4/Smad4* ve *SMAD2* genlerinin, kolorektal kanser vakalarının üçte birinde delesyona uğradığı gösterilmiştir. Bu genler, hücre büyümesini kontrol eden TGFβ sinyal yolağında görev almaktadırlar. TGFβ yolağı, epitel hücrelerinde büyümeyi önleyici etki göstermektedir ve kolon adenokarsinom hücreleri genellikle TGFβ yolağının hücre üzerindeki bu etkisine direnç göstermektedir. *SMAD4*' te meydana gelen mutasyonlar sonucunda kolorektal kanserle ilişkili

juvenile polip sendromu oluşmaktadır (43). *SMAD4* geni, pankreas kanserlerinin %90' ında, Kolorektal kanserlerin ise %10-15' inde kromozomal kararsızlığa neden olmaktadır. *APC* geni kaybı ile FAP modeli oluşturulan farelerde *SMAD4*' ün deneysel olarak inaktivasyonu adenomatoz poliplerin kansere dönüşümüne yol açmaktadır (44, 45).

2.3.1.1.4. *KRAS* ve *BRAF* genlerindeki Mutasyonlar

Proto-onkogenler, hücrede sinyal uyarı iletiminde ve hücre büyümesinin kontrolünde rol oynamaktadırlar ve bu genlerin aktivasyonları sonucunda hücre proliferasyonu artmaktadır. *RAS* gen ailesi içerisinde yer alan *KRAS* geni, kromozom 12' nin kısa kolunda lokalizedir. *KRAS* proto-onkogeni, EGFR sinyalinin *BRAF* aracılıklı MAPK sinyal mekanizmasında yer alan ve bir moleküldür. 21 kda büyüklüğünde bir protein kodlayan bu gen hücresel proliferasyonda rol oynamaktadır (46).

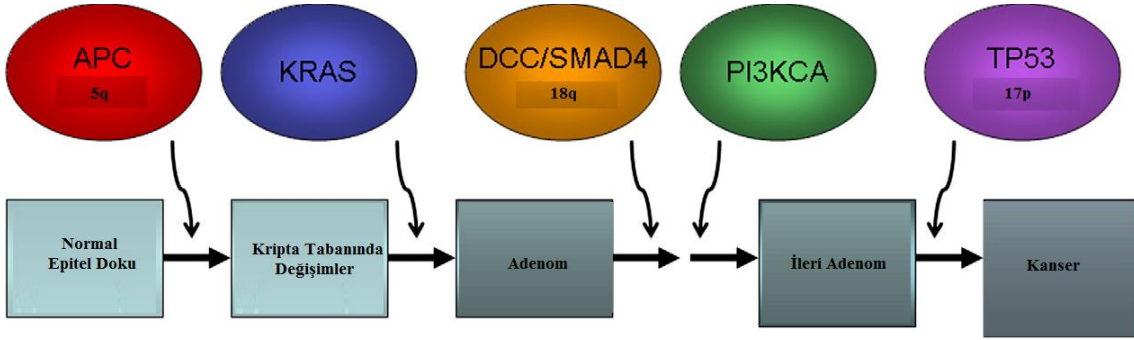
KRAS proteini, MAPK sinyal yolağında ekstrasellüler sinyallerin iletiminde rol alan, GTP bağlayabilen bir membran proteinidir. Bu gen, sitoplazma zarının içinden efektör moleküllere sinyal iletimini sağlayan GTP-az aktivitesine sahip bir protein kodlamaktadır. Hücre büyümesini ve bölünmesini uyaran herhangi bir dış uyarı ile *KRAS* geni GTP'ye bağlanır ve aktif hale geçerek uyarıyı hücre içi ileti yollarına aktararak hücre büyüme ve bölünmesinde fizyolojik rol oynar. *KRAS* mutasyonu ile GTP-az aktivitesi ortadan kalkar ve hücre proliferasyonunun düzeni bozulur (47, 48).

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %20-50' inde *KRAS* genine ait kodon 12, 13 veya 61' de mutasyonlar gözlenmektedir. Bu mutasyonlar; *RAS* proto-onkogenlerinin onkogenlere dönüşmesine neden olur ve bu kontrolsüz hücre büyümesi ve çoğalmasıyla sonuçlanır (46). Yapılan çalışmalarda, *KRAS* proto-onkogeninin tek başına aktivasyonu, karsinom oluşumu için yeterli görünmemekle birlikte adenom büyüklüğünün artışı ile ilgili süreçte rol oynayabileceği tartışılmıştır (49).

7. kromozomun uzun kolunda yer alan *BRAF*, EGFR sinyal yolağında yer alan diğer önemli bir genidir. Kolorektal kanserlerin %10-15'inde *BRAF* geninde V600E mutasyonu saptanmıştır (50). *KRAS* ve *BRAF* mutasyonlarından herhangi birinin varlığı MAPK yolağının aktivasyonu ile tümör oluşumunun başlaması için yeterlidir. *BRAF* mutasyonuna MSI içeren tümörlerde sıklıkla rastlanılmaktadır (51). Günümüzde *BRAF* mutasyon analizi kolorektal kanser taramalarında, tanısında ve prognozunda kullanılmaya başlanmıştır.

Kolorektal kanser oluşumuna neden olan tüm bu genetik değişimler incelendiğinde, normal kolon mukozasından adenom gelişiminde kromozom 5q' daki allelik kayıp en erken meydana gelen değişiklikler arasında olduğu görülmektedir. Ras geni mutasyonu küçük

adenomun ortaya çıkışı sürecinde oluşmaktadır. Kromozom 18q' daki allelik kayıplar sıklıkla büyük ve displazik adenomlarda görülürken kromozom 17p' deki allelik kayıplar ise sadece ileri evre tümörlerde bulunmakta olup ileri derecede displazik adenom oluşumunda ve karsinoma dönüşümünden sorumludur (52) (Şekil-4).



Şekil-4 Kolorektal Kanser Gelişiminin Moleküler Modeli (52)

2.3.1.2. Mikrosatellit Kararsızlık (MSI) Yolağı

Kolorektal kanserlerin %15' i MSI mekanizması ile meydana gelmektedir ve bu şekilde oluşan tümörlerin büyük bir kısmı sporadik kökenlidir (14).

Mikrosatellitler; genom içerisinde dağılmış tekrar eden kısa dizilerdir. Bir ya da daha fazla bazın yüz defaya kadar tekrar etmesi sonucunda oluşan bu bölgelerde meydana gelen delesyon ya da insersiyonlar, ilgili bölgenin uzunluğunu değiştirerek MSI' ye neden olmaktadır. MSI, DNA replikasyonuna bağlı hatalar sonucunda oluşmaktadır. Bu hataların tanımlanmasında ve düzenlenmesinde *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *MSH3* ve *PMS2* gibi birçok DNA tamir geninin (MMR) görev aldığı mismatch tamir mekanizması rol oynamaktadır. MSI, DNA mismatch tamir genlerinin metilasyon ya da somatik mutasyonlar ile inaktivasyonu sonucunda oluşmaktadır. MSI gösteren kolorektal tümörlerin çok azı ailesel olup Lynch sendromu ile ilişkilidir (53). Lynch sendromlu (hereditär non-polyposis kolorektal kanser, HNPCC) bireylerde, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ve *PMS2* genlerinde var olan germ-line mutasyonların varlığı nedeniyle genellikle MSI görülmektedir. Bunun yanında *MLH1* geni promotör bölge metilasyonları sonucunda meydana gelen MSI durumu sonucunda sporadik kolorektal kanserlerde görülmektedir (54).

MSI durumu, kolorektal kanser hastalarının tümör alt tiplerinin sınıflandırılmasında yardımcı olabilmektedir. MSI pozitif tümürlü hastaların mikrosatellit kararsızlık göstermeye (MSS) tümöre sahip hastalara oranla daha iyi prognoza sahip oldukları gösterilmiştir. Yüksek hasta sayısına sahip çalışmalarda ise sağ kalım oranının MSI hastalarında daha yüksek olduğunu

gösterilmiştir. Günümüz rutin uygulamalarda MSI durumunun varlığı, MMR proteinlerinin immünohistokimyasal analizleri ile ve PCR tabanlı testler ile belirlenen MSI durumu prognostik belirteç olarak kullanılmaktadır (55).

2.3.1.3. Gen Ekspresyon Değişimleri

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle beraber kanser araştırmalarında, birçok genin ekspresyon profillerinin incelenmesine olanak sağlayan array sistemleri kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar ile gen ekspresyon düzeylerinin farklı kanser tiplerinde ve aynı kanser farklı tümör alt tiplerinde de değişimler gösterdikleri belirtilmektedir. Batı toplumlarında yapılan çalışmalarla (56) farklı kanserlere ait tümör dokularda gen ekspresyon profilleri tanımlanmış ve tanı ve tedavide biyobelirteç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte, gen ekspresyon profillerinin etnik kökene göre değişimler gösterdikleri saptanmıştır. Batı toplumlarında *STAT3*, *RASSC1*, *DOKS* ve *ERBB2* gen ekspresyon değişimleri kolorektal kanser ilaç dirençliliği ile ilişkilendirilmiştir (57). Kolorektal tümörlerde *CK20*, *MAP3K8* ve *EIF5A* genlerinin yüksek ekspresyon seviyelerinin ise Türk popülasyonuna ait erken yaşta tanı almış hastalar için birer kötü prognoz belirteçi olabilecekleri belirtilmiştir (58). Mevcut çalışmaların bu bulguları etnik kökeni farklı popülasyonlara ait hastaların gen ekspresyon profillerinin değişiklik gösterdiğini ve farklı hasta popülasyonları için değişik biyobelirteçlerin belirlenmesine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

2.3.2. Epigenetik Değişimler

2.3.2.1. CpG Adalarında Meydana Gelen Metilasyon Mekanizmaları (CIMP)

Kolorektal kanser patogeneğinde en yaygın görülen olay genomik kararsızlık olmasına rağmen, özellikle DNA metilasyonu gibi epigenetik değişimlerde bu malignansinin oluşumunda yer alan önemli mekanizmalardır (55). Genomik kararsızlık içerisinde yer alan MSI durumunun temel oluşum sebeplerinden biri aslında MMR genlerinde meydana gelen metilasyonlardır. *MLH1* gibi tümör baskılayıcı genlerin CpG adalarında metilasyonların oluşması sonucunda transkripsiyonel inaktivasyon gözlenmektedir. Toyota ve arkadaşları, bu gibi genlerin promotör bölgelerindeki CpG adalarında meydana gelen metilasyonları CIMP mekanizması olarak tanımlamışlardır (59).

2.3.2.2. mikroRNA (miRNA) ' lar

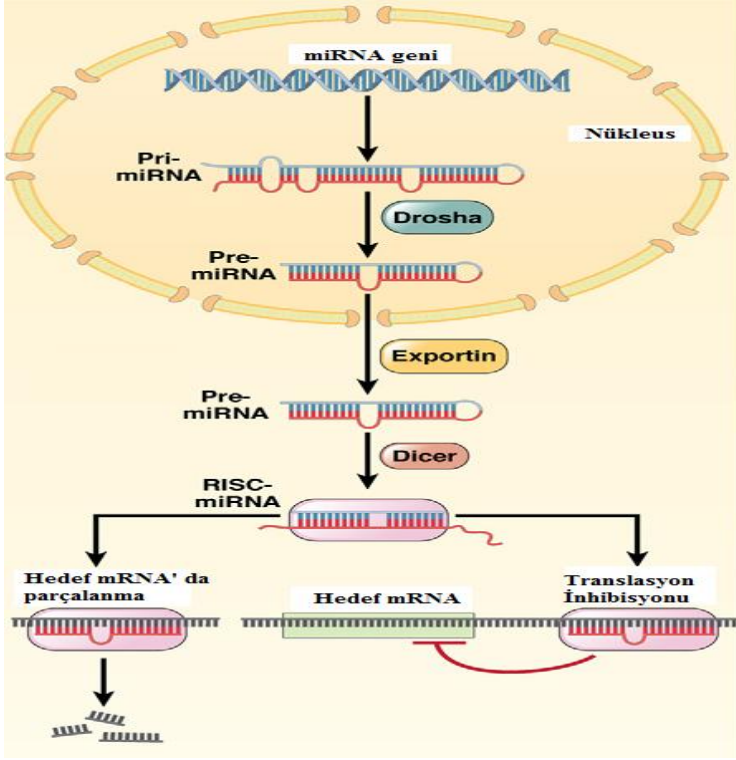
Son yıllarda, moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ile hücre biyolojisinde etkili olan yeni moleküller tanımlanmaya başlanmıştır. 2000' li yılların başlarından itibaren, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat protein dönüşümü gerçekleşmeyen RNA molekülleri keşfedilmiştir. 20-24 nükleotid büyüklüğündeki bu küçük RNA molekülleri mikroRNA (miRNA) olarak tanımlanmaktadır (2-5). Günümüzde 5922 adet miRNA tanımlanmıştır ancak yeni tanımlanan miRNA' lar ile beraber bu sayı her geçen gün artış göstermektedir (60). Yapılan ilk çalışmalarda, bu moleküllerin hücre büyümesi ve hücre ölümünde etkili oldukları belirlenmiş ve bunun üzerine miRNA' ların kanser dokularında araştırılması söz konusu olmuştur. Araştırmacılar bu küçük RNA moleküllerinin hücrel birçok temel işlevin düzenlenmesinde görev aldığını, bununla birlikte, hücrede miRNA ekspresyonunun normal seviyelerinin dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (4). miRNA' lar, RNA interferansı olarak adlandırılan gen susturma mekanizmasında yer almakta ve fonksiyonel olarak gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası (post-transkripsiyonel) düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar (61).

2.3.2.2.1. miRNA' ların Yapısı ve Biyogenezi

miRNA' ların oluşumu, çekirdek içerisinde, genomik DNA üzerindeki ilgili genlerden primer miRNA' nın (pri-miRNA) transkripsiyonu ile başlamaktadır. 500 ile 3000 arası baz çiftine sahip olan pri-miRNA, "saç tokası; hairpin" olarak adlandırılan, "cap" ve "Poli A" uzantılarına sahip bir yapıdan oluşmaktadır (3, 62).

Pri-miRNA, RNAaz II enzimi tarafından genomik DNA' dan sentezlenmektedir. Çekirdek içerisindeki bu yapı, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından kesilerek yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA' ya dönüştürülmektedir. Bu molekül, nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP' ye bağımlı şekilde stoplazmaya taşınmaktadır. Pre-miRNA' lar, sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı nükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA dubleksine çevrilmekte ve aynı zamanda RISC yapısının oluşumunu başlatmaktadır (63). Dicer, pre-miRNA' nın "saç tokası" yapısını kesmektedir. Bu dubleks ayrılmakta ve iki iplikten sadece biri RISC kompleksi ile etkileşmektedir. RISC kompleksinin içinde yer alan ve bir RNAaz olan Argonaute' nın (Ago2) etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olan seçilmekte ve klavuz iplik olarak adlandırılmaktadır. Diğer iplik anti-klavuz yada yolcu iplik olarak tanımlanmakta ve RISC kompleksi tarafından sindirilmektedir. Olgun miRNA' yı da içerisine alan RISC kompleksi,

hedef mRNA' nın 3' translyasyona uğramayan (3'UTR) bölgesiyle baz eşleşmesi yaparak bu mRNA' nın yıkımını sağlamakta yada protein sentezlemesine engel olmaktadır (64) (Şekil-5).



Şekil-5 Normal Bir Hücrede miRNA' ların Sentezi ve İşlevi (64)

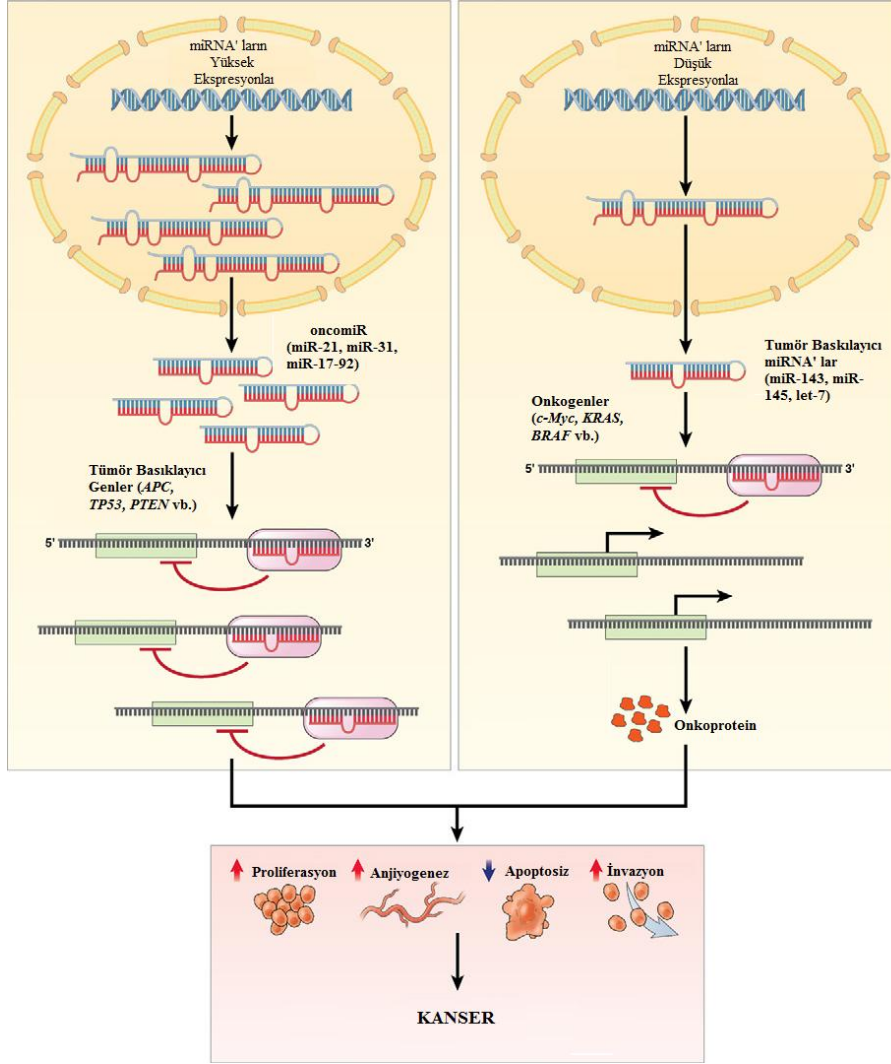
2.3.2.2.2. miRNA' ların Kansereleşme Sürecindeki Rollerini

miRNA' lar, transkripsiyon sonrası, genlerin ekspresyonlarını azaltarak gen ifadesini kontrol eden RNA molekülleridir. İnsan miRNA' larının yaklaşık %50' si, DNA üzerinde kanserle ilişkili genomik bölgelerden veya frajil bölgelerden kodlanmaktadır. Kromozomlar üzerinde yer alan frajil bölgeler, kromozomlarda boşluklar, kırıklar oluşması ve kromozomların yeniden düzenlenmesi sonucu meydana gelen hassas ve kırılabilir bölgeler olarak tanımlanmaktadır. Frajil bölgeler üzerine yapılan çalışmalar (65, 66) ile bu bölgelerin, bazı kanser türlerinde delesyon, duplikasyon ve/ veya translokasyon ile ilişkili kromozom kırıklarına yatkınlığı arttırdığı belirtilmektedir. Son yıllarda elde edilen deneysel veriler, kırılma bölgelerinde veya yakın bölgelerinde bulunan genlerin tümör oluşumunda rol oynadığını göstermektedir. 1990 yılında Yunis' in (67), 16 farklı mutajen ve kanserojen kullanarak gerçekleştirdiği çalışmada, 110 frajil bölge tespit edilmiştir. Bu bölgelerden 73'ü kanser kromozom kırıkları ile 21'i belli kromozomların bant ve subbantlarında haritalanmış olan onkogenler ile aynı bölgede oldukları gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, frajil bölgelerin, çeşitli mutajenik etkenlerin hedef bölgeleri olduğu, mutajen ve kanserojenlerin nokta mutasyonları şeklinde genomik değişikliklere yol açtığı ileri sürülmüştür.

İnsan genomunda sık gözlenen bir frajil bölge olan FRA3B (3p14.2) bölgesinde yapılan moleküler analizler, bu bölgenin bazı kanser tiplerinde yatkınlığı arttırdığını ortaya çıkarmıştır. Başta akciğer kanserleri olmak üzere birçok kanser türünde etkili olduğu bilinen FHIT tümör süpressör geni FRA3B bölgesi içerisinde yer almaktadır ve bu gende meydana gelen bir frajilite ve/veya delesyon, genin inaktive olmasına sebep olmaktadır (68). Yapılan çalışmalar (69, 70) ile sık gözlenen diğer bir frajil bölge olan FRA7G (7q31.2)' nin; kolon karsinomaları, ovaryum adenokarsinomaları, renal hücre karsinomaları, baş ve boyun hücre karsinomalarında olduğu kadar akciğer ve prostat kanserlerinde de sık gözlenen 1 Mb' lık delesyon bölgesi içerisinde olduğu gösterilmiştir. FRA7G, insan kanserlerinde yüksek sıklıkta delesyona uğrayan bir bölge olup, caveolin 1 ve 2 genlerinin (CAV1 ve CAV2) bu bölgenin çevresinde yerleşik olduğu ve bunların tümör baskılayıcı özellikte oldukları bilinmektedir. Tunca ve arkadaşları (71) 1999 yılında, rektum kanseri tanısı almış 36 hastada, aphidicolin (Apc), 5-bromodeoxyuridine (BrdU) ve kafein mutajenlerini kullanarak 17 farklı frajil bölge tespit etmişler ve rektum kanserlerinde frajil bölge ekspresyon artışının, önemli bir genetik yatkınlık biyobelirteci olabileceğini vurgulamışlardır. Ayrıca rektum kanserli hastalarda belirlenen bu 17 frajil bölge içerisinde, kolorektal kanser oluşum sürecinde önemli role sahip olan *APC* ve *MCC* genlerinin lokalize olduğu 5q21 ve DNA mismatch tamir genlerinden *hPMS1* ' in lokalize olduğu 2q31-31 frajil bölgesi de yer almaktadır. Tunca ve arkadaşları (72) 2000 yılında aynı mutajenleri kullanarak, 30 normal bireyden oluşan kontrol grup ile karşılaştırdıklarında, 32 kolon kanseri hastasında frajil bölge miktarında artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışma sonucunda, yapılan araştırmalar ile çeşitli kanserlerde yaygın görülen frajil bölgelerin başta kolon kanseri olmak üzere birçok kanser için belirteç olabileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde, bu çalışmanın bulguları, belirlenen frajil bölgelerde kolorektal kanserin gelişim sürecinde önemli olduğu bilinen genlerin yerleşik olduğunu ifade etmektedir.

miRNA' ların, kanser oluşumuyla ilişkilendirilen frajil bölgelerden kodlanmaları neoplazi patogenezinde önemli rolleri olduğuna işaret etmektedir. Bazı miRNA' ların hücre proliferasyonunu arttırırken, diğerlerinin azalttığı, böylece bu moleküllerin kanser gelişiminde onkogenler ya da tümör baskılayıcı genler gibi görev aldıkları görülmektedir (75). Normal dokularda miRNA' lar, büyüme, gelişme, farklılaşma ve hücre çoğalması gibi önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesini kontrol etmektedirler (76). Bu süreçlerde miRNA' ların bir kısmı onkogenik bir kısmı ise tümör baskılayıcı etkiye sahiptir. Onkogenik miRNA' lar, normal dokuda hücre çoğalmasını baskılayan proteinlerin mRNA' larına bağlanıp onların etkinliğini azaltmaktadırlar. Bu miRNA' ların miktarında anormal bir artış olduğunda ise

baskılayıcı proteinlerin ekspresyonları çok azalmakta ve sonuç olarak hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalmaktadır. Tümör baskılayıcı miRNA' lar ise sağlıklı dokularda hücre çoğalmasını uyarır ya da hücre ölümünü baskılayan proteinlerin mRNA' larına bağlanarak bunların ekspresyon seviyelerini azaltmaktadırlar. Böylece hücre çoğalması kontrolsüz bir şekilde uyarılmakta ya da hücre ölümü gerçekleşmemektedir (Şekil-6).



Şekil-6 Tümör Hücresinde, Tümör Baskılayıcı ve Onkogenik Özellik Gösteren miRNA' ların İşlevleri (64)

miRNA' ların birden fazla potansiyel hedefleri vardır, hücresel durumuna göre bir miRNA, tümör baskılayıcı miRNA (TS-miR) ya da onkogenik miRNA (onko-miR) özelliği gösterebilmektedir.

Son dönemlerde miRNA ekspresyon seviyelerinin tümörlü dokularda değişiklikler gösterdiğini açıklayan birçok çalışma bulunmaktadır. miRNA' ların kanserle ilişkisini ilk olarak kronik lenfositik (KLL) hastalarda gözlemlenmiştir (75). KLL' li hastaların %50' sinde 13q14 delseyonu mevcuttur. Yapılan çalışmada (76, 77) 13q14 bölgesinde sadece mir-15a ve

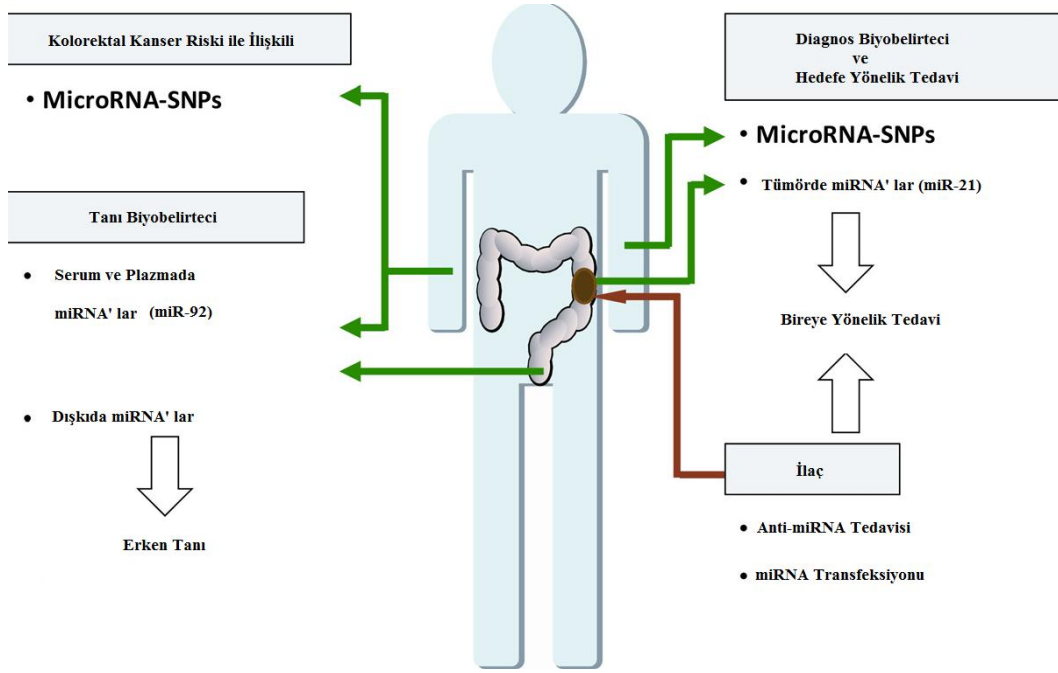
mir-16-1 genlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra 245 insan ve fare miRNA probu içeren miRNA microarray çalışması ile miR-15a ve miR-16-1' in ekspresyon düzeylerinin B hücreli KLL hastalarında belirgin şekilde azaldığı gözlenmiş ve böylece miRNA ekspresyon profillerinin KLL hastalarının klinik ve biyolojik davranışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Calin ve ark. (76) 2004 yılında yayınladıkları diğer bir çalışmada, insan miRNA genlerinin kanser ile ilişkisini araştırmak için 186 adet miRNA geninin DNA üzerindeki pozisyonunu haritalandırmışlardır. Bu genlerin kromozomal pozisyonları, daha önceden belirli kanserlerin gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen genetik değişiklikler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, miRNA genlerinin çoğunlukla heterozigotinin kaybolduğu bölgeler olarak tanımlanan, amplifikasyonun en az olduğu ve kanser oluşumunda etkili olan, kırılğan (fajil) kısımlara yerleşik oldukları gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalar (77, 78) ile solid tümörlerde, miRNA ekspresyonlarını incelemişler ve ekspresyon seviyeleri değişen miRNA' ları tanımlamışlardır. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla miRNA ekspresyonlarının, farklı tümör tiplerinde değişkenlik gösterdikleri belirlenmiştir (79, 80).

2.3.2.2.3 Kolorektal Kanserde Rol Oynayan miRNA' lar

miRNA' ların ekspresyon profilleri birçok kolorektal kanser hücre hattında, normal ve tümör dokuda incelenmiştir (80). Farklı ekspresyon seviyeleri gösteren miRNA' lar ile tümörün evresi, moleküler alt tipi ve klinik özellikleri arasında ilişki kurulmuş böylece kolorektal tümörlerde ekspresyon değişimleri belirlenen miRNA' ların bu kanserin tanı ve tedavisinde birer biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri belirtilmiştir (81). Çalışmalar (82, 83) miRNA' ların kanda ve serumda sirküle halde bulduklarını göstermektedir. Bununla birlikte miRNA' ların dışkıda da varlıkları tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda miR-92 ve miR-21 gibi bazı miRNA' ların gibi kan ve dışkıdaki varlıklarına bakılarak kolorektal kanserlerde erken tanı belirteci olarak kullanılabileceklerini vurgulanmaktadır (Şekil-7).



Şekil-7 Kolorektal Kanser' in Tanı ve Tedavisinde miRNA' ların Kullanımı (83)

Flow sitometri tekniği ile yapılan çalışmalarda, kolon ve rektum kanserlerini de içine alan farklı tümör tiplerinde miRNA ekspresyon profillerini değerlendirerek miRNA ekspresyon düzeylerinin, normal dokulara kıyasla tümörlerde genel olarak düşük seviyelerde olduklarını belirlenmiştir.

Kolorektal kanser oluşumunda etkili olduğu belirlenen ilk miRNA' lar, miR-143 ve miR-145' tir. Michael ve arkadaşlarının (84) 2003 yılında gerçekleştirdikleri çalışma ile bu iki miRNA' nın, tümör dokuda, normal mukozaya göre düşük seviyelerde eksprese oldukları gözlemlenmiştir. Akao ve arkadaşları (85), kolorektal kanser hücre hattı olan SW480' de, miR-143' ün *KRAS* genini, miR-145' in ise *cMYC* genini hedef alarak bu genleri baskıladıklarını bildirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda yapılan birçok araştırma ile bu miRNA' ların kolorektal kanser gelişimde tümör baskılayıcı rol üstlenerek tümörün klinikopatolojik özellikleri ile ilişkilendirilebilecekleri gösterilmiştir (86).

Let-7 ailesi, ilk keşfedilen miRNA ailelerinden biridir. Bu grup içerisinde yer alan miRNA' ların ekspresyonları birçok kanserde anlamlı değişimler göstermektedir. Akao ve arkadaşlarının (85) gerçekleştirdikleri çalışmada, let-7' nin kolorektal kanser tümörlerinde düşük seviyede eksprese olduğu ve tümör baskılayıcı rol oynadığı belirtilmiştir. Let-7 ailesi üyesi olan let-7c' nin *MMP1* ve *PBX3* genlerini hedef alarak kolorektal tümörlerin büyümesini ve metastaz oluşumunu engellediği bilinmektedir.

Kolorektal kanser gelişimiyle ilişkilendirilen önemli bir diğer miRNA ailesi miR-200' dür. Bu aile içerisinde yer alan miR-200c, kolorektal tümörlerde *ZEB1* genini hedef alarak kanser hücrelerinin metastaz yapma özelliklerini engellemektedir. Bununla birlikte, miR-499-5p ekspresyonu, kolorektal kanser hücre hatlarında yüksek görülmektedir. Bu miRNA *FOXOS* ve *PDC4* genlerini hedef alarak akciğer ve karaciğer metastazına neden olmaktadır (87).

Mir-34a, kolorektal kanser tümörlerinde hücre proliferasyonunu inhibe eden miRNA' lardan biridir. HTC116 ve RKO kolon kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar ile bu miRNA' nın *E2F* ve *TP53* genlerini hedef aldığını ve hücre siklusuna etki ettiğini göstermişlerdir (88). miR-365, *CCND1* ve *Bcl-2* genlerini etkileyerek hücre siklusunda rol oynayan diğer bir miRNA'dır. miR-192 ve miR-215' te *TP53* gen fonksiyonunu baskılayarak hücre siklusuna etki etmektedirler (89).

Mikroarray analizleri kullanılarak yapılan çalışmalar, kolorektal kanser oluşum sürecinde etkili farklı miRNA' ları tanımlanmaktadır. Slaby ve arkadaşları (90), miR-21 ekspresyonunun kolorektal tümör gelişim süreci ile ilişkili olduğunu belirmişlerdir. Bu çalışmada miR-21' in, kolorektal kanserde uzak metastaz ve lenf nodu pozitifliği ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, miR-21' in, tümör baskılayıcı bir gen olan *PDCD4*' ü etkileyerek tümörde hücre invazyonunu artırarak metastaz oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, kolorektal tümörlerde yüksek miR-21 ekspresyonunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu ortaya konmaktadır (91).

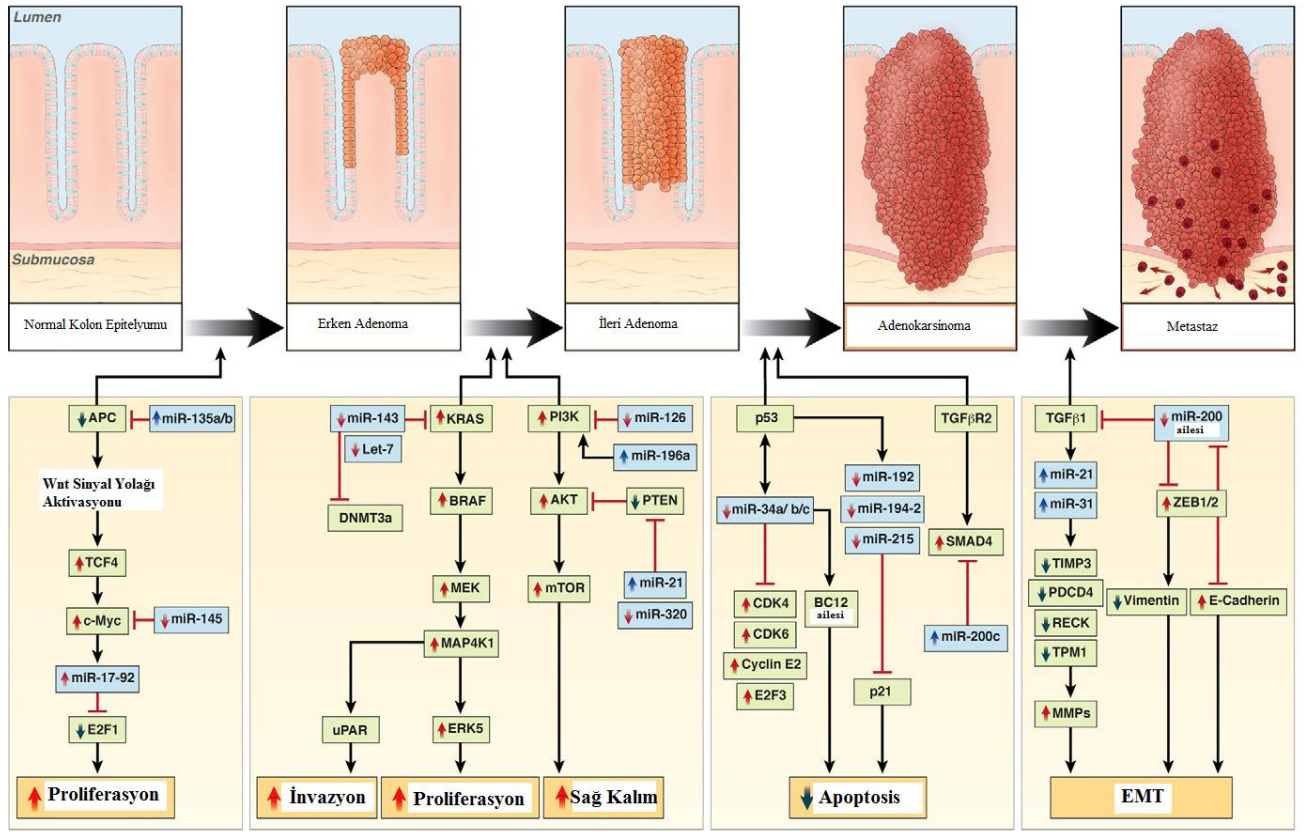
Tümör gelişim sürecinde önemli bir miRNA olan miR-155 ise kolorektal kanser tümörlerinde sıklıkla up-regüle olup *TCL1*, *BCL2*, *TP53*, *PTEN* gibi tümör baskılayıcı genleri hedef almaktadır (92). Kolorektal tümörlerde, miR-155 ekspresyon seviyesinin normal dokulara kıyasla tümörlü dokularda önemli derecede yüksek bulunması, ilerlemiş tümör evresi ve lenf nodu metastazı ile korelasyon göstermektedir. miR-155 ekspresyonunun, kolorektal kanserli hastalar için terapötik hedef ve bağımsız bir prognostik faktör olarak kabul edilebileceği ifade edilmektedir. Bununla birlikte bu miRNA' nın yüksek ekspresyonunun bazı lösemi tiplerinde ve akciğer adenokarsinomlarında tümörün agresifliği ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-155' in katı tümörlerde ve hematolojik malignansiler ile birçok malign olmayan hastalıkta da regülasyonunda bozukluk görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda (93, 94) miR-155' in ekspresyonundaki artışın malignansilerin birkaç tipinde kötü genel sağkalım ve geç evre ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. miR-155' in pediatrik Burkitt lenfoma, Hodgkin hastalığı, DLBCL (diffüz

büyük B hücreli lenfoma), kolon ve pankreas kanserlerinde overekspresye olduğu belirlenmiştir (93).

Kolorektal kanserlerde regülasyonunda düzensizlik belirlenen miRNA' lardan biri miR-125b' dir. miR-125b ekspresyonu, kolon ve rectum tümörlerinde down-regüledir ve kolorektal kanser hücre hatlarında ekspresyon seviyesi azalmıştır. Yapılan mikroarray analizleri sonucunda (93-95), miR-125b ekspresyon düzeyinde azalma olduğu yapılan çalışmalar ile ifade edilmiştir. Bir tümör baskılayıcı gen fonksiyonu ile uyumlu olan miR-125b' nin hedefleri arasında ovaryum kanserinde proto-onkogen olan *BCL3* ve *E2F3*, meme kanserinde ise *ETS1* ve kolorektal kanser sürecinde etkili bir onkogen olan *MUC1* bulunmaktadır.

2.3.2.2.4. Kolorektal Kanser Oluşumunda Etkili Olan Sinyal Yolaklarında miRNA' ların Rolü

Kolorektal kanser çeşitli genetik ve epigenetik değişimler sonucunda meydana gelmekte olup tümör oluşumu karmaşık bir sürece sahiptir. WNT/ β -katenin, EGFR, P53 ve EMT (Epiteryal-mezenşimal geçiş) sinyal yolları kolorektal kanser gelişim sürecinde etkili olan başlıca mekanizmalardır (14, 95). miRNA' lar, bu sinyal yollarında bulunan genleri hedef alarak kolorektal kanser gelişiminde görev almaktadırlar (Şekil-8)



Şekil-8 Kolorektal Kanser Oluşum Basamakları ve Bu Basamaklarda Görev Alan miRNA' lar (64)

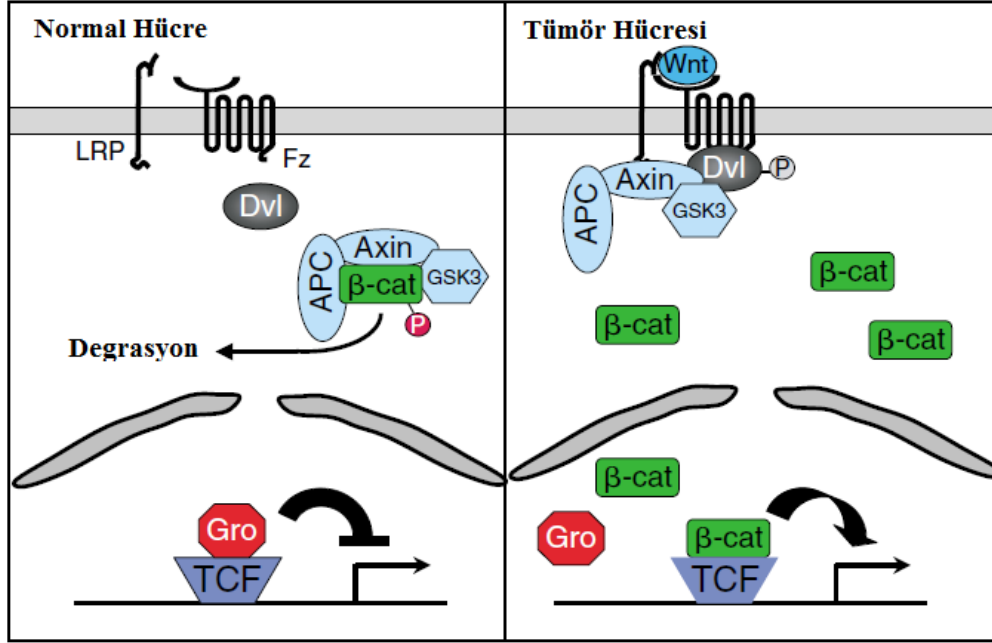
2.3.2.2.4.1. WNT/β-katenin Sinyal Yolağında miRNA' ların Rolü

Wnt/β-katenin sinyal yolu, hücre siklusunun düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre-hücre adezyonunda, tümör oluşumunda ve sinaps oluşumu, adipogenez ve angiogenez gibi önemli biyolojik olaylarda rol almaktadır. Bu sinyal yolağı erken kolorektal tümör gelişiminde önemli ve merkezi bir role sahiptir (94).

Wnt/β-katenin sinyal mekanizması Wnt proteininin hedef hücre zarına ulaşarak, burada bulunan reseptörlerine (Fz ve LRP5/6) bağlanması ile başlamaktadır. Wnt proteininin reseptörlerine bağlanması ile hücre zarında konformasyonel değişimler meydana gelmektedir (31). Böylece hücre zarının iç kısmı ile etkileşmesi gereken proteinler yerine farklı proteinler bağlanmakta ve yeni bir sinyal aktarımı oluşmaktadır. Bu aktarım bazı proteinlerin (Dvl ve LRP5/6) fosforillenmesi ile gerçekleşmektedir.

Wnt sinyal yolağındaki en önemli moleküller β- katenin ve APC proteinleridir. Normal hücrelerde APC proteini Axin, GSK3β ve CKI ile etkileşerek yıkıcı kompleksi oluşturmaktadır. Bu kompleks sağlıklı hücrelerde β-kateninin yıkımını sağlamaktadır. Wnt sinyal yolağı aktif olduğunda yıkıcı kompleks oluşamamakta ve hücrede β-katenin

birikmektedir. Biriken β -katenin nükleusa geçmekte ve *MYC*, *Cyclin D1* gibi onkogenlerin transkripsiyonunun artmasına sebep olmaktadır (32) (Şekil-9).



Şekil-9 Wnt Sinyal Yolağı (32)

APC hücrede birçok biyomolekül ile etkileşim halinde bulunmakta ve bu özelliği nedeniyle “multidomain” bir protein olarak kabul edilmektedir. Birçok bağlanma bölgesi içeren bu protein, wnt sinyal yolağında β -katenin, GSK3 β ve Axin proteinleri ile etkileşmektedir.

APC proteininin, Wnt/ β -katenin sinyal yolunda üstlendiği görevlerin yanı sıra in vitro koşullarda sitoplazmadaki hücre iskeleti elemanlarından mikrotübüllere bağlandığı ve tübülün polimerizasyonunu uyardığı gözlenmiştir. Ayrıca embriyonik kök hücrelerle yapılan deneylerde APC proteininin mitotik iğ iplikleri ve kinetokorlar ile ilişkili olduğu ve bu proteinin fonksiyon kaybıyla sonuçlanan mutasyonlarda, kromozomların ayrılmasında da çeşitli bozukluklar meydana geldiği ifade edilmiştir (33, 34).

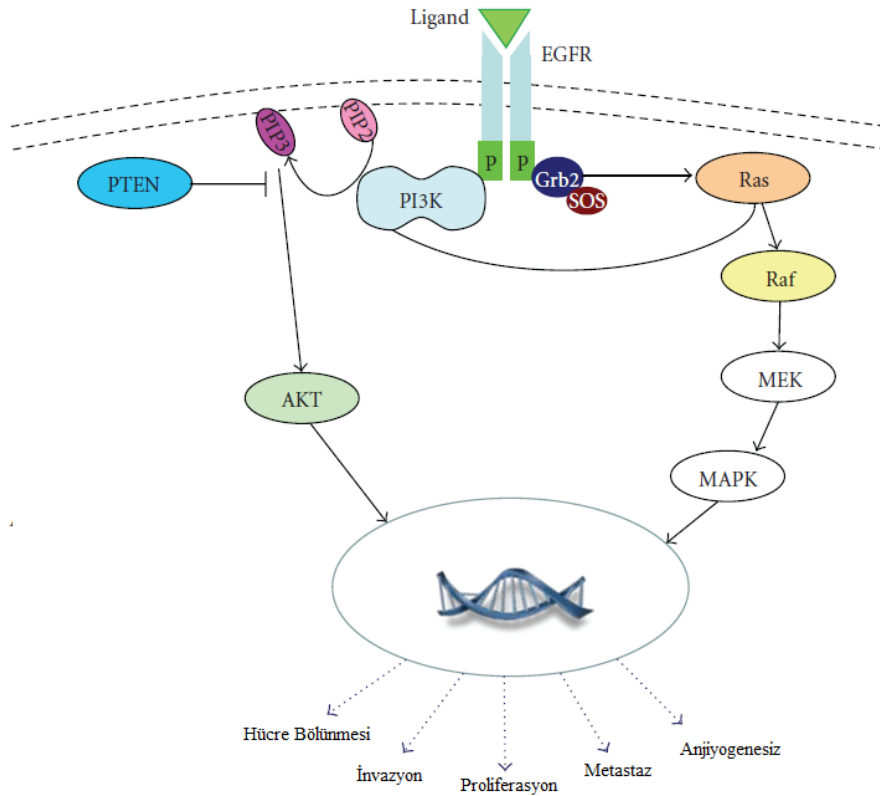
Kolorektal karsinogenezin başlamasında majör olay olan APC gen inaktivasyonu, kolorektal adenoma ve karsinomların %60’ ında saptanmakta ve bu da Wnt/beta katenin yolu aktivasyonunun neden olmaktadır. Nagel ve arkadaşlarının (96) son dönemde yaptıkları çalışma ile, miRNA’ ların, kolorektal kanserde, APC mRNA’ sını hedef alarak Wnt/ β -katenin sinyal yolağının regülasyonunda rol oynadıkları belirtilmiştir. Yapılan çalışmalarda (92-94), gastrointestinal kanserlerde, miR-221’ in APC genini hedef aldığını gözlemlemişleridir. Nagel ve arkadaşlarının (96) yaptıkları çalışma ile miR-135a ve miR-

135b' nin APC mRNA' sının translasyona çevrimini baskıladıkları gösterilmiş ve in vitro deneyler ile bulgular desteklenmiştir.

2.3.2.2.4.2. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü) Sinyal Yolağında miRNA' ların Rolü

EGFR sinyal yolağı, kanser oluşum sürecinde meydana gelen temel hücrel olayların düzenlenmesinde görev almaktadır. EGFR proteini, akciğer, baş ve boyun, pankreas, meme, over ve kolon gibi birçok tümörde yüksek seviyede ekspresyon göstermektedir. EGFR sinyal yolağında meydana gelen mutasyonlar, gen amplifikasyonları ve çeşitli proteinlerin yüksek ekspresyonları sadece kanser oluşumunu başlatmamakta bunun yanında hastalığın prognozunu ve hedefe yönelik ilaç tedavisini de etkilememektedir (11, 97).

EGFR sinyal yolağı hücre içi sinyal taşımında önemli olan iki sinyal yolağının (MAPK ve PI3K) aktivasyonunu sağlayarak kolorektal kanser oluşumunda etkili olmaktadır (Şekil-10).



Şekil-10 EGFR Sinyal Yolağı (98)

Chen X ve arkadaşları (92) 2009 yılında yaptıkları çalışma ile kolorektal kanserlerde EGFR sinyal yolağını hedef alan miRNA' ları belirlemişlerdir. Çalışmada 200 adet miRNA' nın ekspresyon profilleri değerlendirilip, EGFR sinyal yolağında yer alan genler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda (100), miR-143' ün *KRAS* geninin 3' UTR

bölgesini hedef alarak bu gene ait translayonu baskıladığı ve böylece EGFR sinyal yolağının alt basamağında yer alan RAS/RAF/MEK/ERK yolağını etkilediği gözlemlenmiştir.

Yukihiro Akao ve arkadaşları (101), kolon kanser hücre hatlarında gerçekleştirdikleri çalışmalar ile let-7a' nın *KRAS* genini hedef alarak metastazı engellediğini göstermişlerdir.

Son dönemde HTC-116 hücre hattında yapılan çalışmalarla (100) kolorektal kanser oluşumunda etkili olduğu bilinen miR-34a' nın RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolağının baskılanmasında rol oynadığı belirtilmiştir.

2.3.2.2.4.3. P53 Yolağında miRNA' ların Rolü

Kanser oluşum sürecinde hücrede meydana gelen en etkili ve temel mekanizma apoptozdan kaçıştır. Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozda en önemli molekül p53 proteindir. p53, 17. kromozomun p13-1 bölgesine lokalize olan *TP53* geni tarafından kodlanmaktadır. 11 ekzondan oluşmakta olup 20kb' ı kapsamaktadır. Sırasıyla p63 ve p73' ü kodlayan, *TP63* ve *TP73* genlerinin de dahil olduğu büyük ölçüde korunmuş gen ailesi sınıfına aittir (102). *TP53* geninin her iki alleldeki kaybı (heterozigotluk kaybı) veya nokta mutasyonları başta kolorektal kanser olmak üzere birçok tümörde gösterilmiştir. Kolorektal kanserlerin yaklaşık %50-75' inde *TP53* inaktivasyonu gözlenmektedir (103).

TP53 geninin allelik heterozigosite kaybına (LOH) yol açan mutasyonlara insan kanserlerinin yaklaşık olarak %50'sinde rastlanılmaktadır (32). *TP53* geninde saptanan bu mutasyonlar, genin tümör baskılayıcı işlevini ortadan kaldırmaktadır. Ancak *TP53* mutasyonları ile histolojik tümör evreleri arasında anlamlı istatistiksel ilişki kurulamamakta ve bu konuda yapılan araştırma sonuçları birbirleriyle çelişmektedir (55). Literatürde, kolorektal kanserlerdeki *TP53* ekspresyon düzeylerinin araştırıldığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar da, mutasyon analizi sonuçları gibi birbirleriyle uyumsuzluk göstermektedir. İmmünohistokimyasal yöntemlerin kullanıldığı bu çalışma sonuçlarına göre, *TP53* ekspresyon düzeyi ile klinik ve patolojik özellikler arasında anlamlı istatistiksel ilişki kurulamamaktadır. Bununla birlikte, son dönemde yapılan gen ekspresyon alışmaları, *TP53* ekspresyon düzeyinin kolorektal kanserde yüksek proliferasyon indeksi ve migrasyon ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu parametreler kısa ömür ile ilişkili olduğundan *TP53* mutasyon varlığı kötü prognoz ile de ilişkilendirilmiştir. Yine *TP53* ekspresyon düzeyleri ile hastalara ait patolojik evreler arasında saptanılan istatistiksel korelasyon, bu gen ekspresyon düzeyinin hastaların patolojik evrelerinin belirlenmesinde de bir belirteç olarak kullanılabilineceğini düşündürmektedir. Yapılan bu çalışmalarda hastalığın ilerlemesi, hastalık sonucu, tedaviye

yanıt, tümör gelişimi ile mutant *TP53* ekspresyonu arasındaki ilişkilere bakılarak *TP53*' ün potansiyel bir biyobelirteç olarak kullanılabilirdiği belirtilmektedir (23).

Son dönemde yapılan çalışmalar ile *TP53* genini hedef alan miRNA' lar tanımlanmaya başlanılmıştır. miR-34-a-c ailesinin, transkripsiyon sonrası *TP53* genini etkilediği ve apoptotik hücre oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Bu miRNA ailesi dikkate alınarak yapılan çalışmalar ile özellikle miR-34a' nın hücre döngüsü üzerine etkili olduğu ve başta *TP53* olmak üzere *CDK4/6*, *cyclin E2*, *E2F5*, *BIRC3* ve *Bcl-2* genlerini hedef aldığı gösterilmiştir (104).

2.3.2.2.4.4. Hücre Dışı Matriksin Bozulması ve Epitelyal Hücreden Mezenşimal Hücreye Geçişinde miRNA' ların Rolü

Bir tümör 2–3 mm çapına ulaşınca, gereken besin maddelerini alarak büyüebilmek için damarlara gereksinim duymaktadır. Kanser hücreleri kan damarlarını kendilerine çekerek, yeni kan damarlarının oluşumunu uyarmaktadırlar. Bu olay anjiyogenez olarak tanımlanmaktadır (105).

Tümör hücrelerinden, 'ligand' adı verilen maddeler salgırlar ve bu moleküller kan damarlarının yüzeyinde ince bir tabaka oluşturan endotel hücrelerini hedef almaktadırlar. Salgılanan ligandların VEGFR-1, VEGFR-2 ve PDGFR gibi endotel hücre zarı reseptörlerine bağlanması, endotel hücrelerinin çoğalmasını uyarır; bu da damar endoteli hücrelerinin hayatta kalmasını, göçünü, invazyonunu ve çoğalmasını kolaylaştırır.

Hücre dışı matriks, tümör hücrelerinin büyümesinde ve kana geçerek metastaz oluşturmasında etkili olan ana elemandır. Hücre içinde kanser sürecini tetikleyen sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda yapısal değişime uğramış proteinler üretilmektedir. Bu proteinlerin hücre zarıyla etkileşmeleri sonucunda ise hücre dışı matriks yapısı bozulmakta ve invazyon, migrasyon ve metastaz oluşumu gerçekleşmektedir (106, 107).

Yapılan çalışmalar (107), birçok tümörün oluşumunda etkili olduğu bilinen miR-21' in çeşitli genleri hedef alarak hücre dışı matriks yapısının değişime uğramasına katkı sağladığını göstermektedir. Kolorektal kanser hücre hatlarında yapılan araştırmalar ile miR-21' in bir tümör baskılayıcı gen olan *PCDC4*' ü hedef alarak hücre dışı matriks yapısını etkilediği ve bunun sonucunda invazyon oluşumu varlığı gösterilmiştir.

Epitel hücreden mezenşimal hücreye geçim olarak tanımlanan EMT, hücrede önemli bir biyolojik süreçtir. EMT morfolojik olarak, e-kaderanın artması, hücre adhesyon kaybı ve hücrenin motilite kazanmasıdır. Hücre kazandığı bu özellikler sonucunda metastaz oluşumu meydana gelmektedir. *ZEB1* geni EMT mekanizmasındaki en önemli elemanlardan biridir.

Özellikle kolorektal kanser ve meme kanserlerinde miR-200 ailesinin üyelerinden olan miR-141 ve miR-200c bu geni hedef alarak EMT aktivasyonunu başlatmaktadırlar. Yine yapılan son çalışmalarda let-7 ailesinde *ZEB1* genini etkileyerek hücrenin invazyon özelliği kazanmasına yol açtığı gösterilmiştir (107).

Sonuç olarak bugüne kadar yapılan araştırmalar ve elde edilen bulgulardan yola çıkarak, miRNA ekspresyon profillerindeki değişimlerin kolorektal kanserinde içinde bulunduğu birçok kanser türünde tanı, takip ve tedavisinde biyobelirteç olarak yararlanılabileceği gösterilmiştir. miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler tek bir gen ürününü etkilemekten ziyade bütün gen düzenleyici sistemini değiştirebilmektedirler. Bu moleküllerin her biri çok sayıda geni hedef alarak birden fazla sinyal yolağını aktif hale getirebilmekte ya da baskılayabilmektedir. Kanser gelişim sürecinde bir biyobelirteç veya terapötik ajan olarak miRNA'lardan yararlanılması için elde edilen bilgilerin belirli standartlara getirilmesi gerekmekte ve yeni araştırma bulgularına ihtiyaç duyulmaktadır. Şimdiye kadar elde edilmiş veriler ışığında çalışmamızda, Türk popülasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan, genç yaşta tanı almış bireylerin tümör doku örnekleri kullanılarak kolorektal kanser gelişiminde önemli olduğu belirlenen 38 miRNA'nın ekspresyon analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece, kolorektal kanser gelişiminde etkili olduğu bilinen bu miRNA'ların, kötü prognoz potansiyeli yüksek, erken yaşta tanı almış Türk popülasyonuna ait kolorektal kanserli hastalarda rolleri belirlenerek bu popülasyona özgü biyobelirteç olarak kullanılabilen miRNA'ların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu sayede ilgili miRNA'ların prognoz, diağnoz ve ilaç dirençliliği konusundaki rolleri daha iyi anlaşılabilirken yeni tedavi hedeflerinin ortaya çıkarılmasına katkı sağlanabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu ve Klinik Özellikler

Bu çalışmada, 50 yaşın altında kolorektal kanser tanısı almış, aile öyküsü bulunmayan 40 hastaya ait tümör dokuda miRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Çalışma grubu, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı' da 1996- 2011 yılları arasında ameliyat olan ve tedavi altına alınan hastalardan oluşturuldu. Belirlenen hastalara ait klinik bilgiler ve lenf nodu metastazı, tümör lokalizasyonu, patolojik evresi gibi tümör özellikleri yine Genel Cerrahi Bölümüne ait arşivden temin edildi. Tümör evresi, gastrointestinal patolojisinde uzmanlaşmış bir patolog tarafından WHO kriterlerine göre oluşturuldu. Hasta grubu; cerrahi müdahale öncesi radyoterapi ve kemoterapi tedavisi görmemiş bireylerden seçildi.

Belirlenen hastaların parafine gömülü normal ve tümör doku materyallerinin temini için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kuruluna başvuruldu. 17 Ocak 2012 tarihli 2012-2/20 numaralı etik kurul izni ile hastalara ait parafin bloklar Patoloji Anabilim Dalı arşivinden temin edildi.

Ameliyat sonrası hastalığın tekrarlaması olarak tanımlanan nüks ve metastaz varlığını gözlemleyebilmek için hastalar, tanı sonrası en az 2 yıllık süre ile takibe alındı. Nüks oluşumuna kadar geçen süre hastaliksız sağ kalım olarak ifade edildi. Klinik takip, ameliyat sonrası biyokimyasal analizler ve görüntüleme teknikleri ve periyodik poliklinik kontrolleri ile yapıldı. Hastalar 1 yıl boyunca her üç ayda bir, bir yıldan sonra 6 ayda bir kontrole çağrılarak ve kolonoskopi yapılarak takibe alındı. Lokal ilerleme ve uzak metastaz durumu bilgisayarlı tomografi / manyetik rezonans görüntüleme cihazları ile radyolojik olarak değerlendirildi. Periyodik olarak fiziksel muayene, rutin kan analizleri ve karaciğer fonksiyon testleri yapılmış olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların, hastalıklı ve hastaliksız ortalama yaşam süreleri hesaplandı. Elde edilen klinik verilerden yararlanılarak hastalar, nüks, lenf nodu metastazı ve uzak metastaz varlığına ve tanı aldıktan sonra hayatta kalma sürelerine göre gruplara ayrılarak değerlendirildi (Tablo-2).

Tablo-2 Hastalara ait kliniksel özellikler

No	Cinsiyet	Yaş	Evre	Lokaliszyon	Müsinöz Komponent	Leaf Nodu Metastazi	Uzak Metastaz	Nüks	Hastalık Tam Tarihi	Metastaz/Nüks	Ölüm Tarihi	Hastaliksız Yaşam Süresi (Yıl)	Ortalama Yaşam Süresi (Yıl)
1	E	18	1	Kolon	-	-	-	-	20.02.2009	-	-	3	3
2	K	44	1	Kolon	-	-	-	-	14.07.2008	-	-	4	4
3	E	34	1	Kolon	-	-	-	-	27.09.1997	-	-	15	15
4	E	38	1	Kolon	+	-	-	+	14.10.2009	2011	-	2	3
5	K	42	1	Rektum	-	-	-	+	23.06.2001	2009	-	8	11
6	K	40	1	Rektum	-	-	+	-	08.07.2009	2011	2011	2	2
7	E	39	1	Rektum	-	-	-	-	06.04.2009	-	-	3	3
8	K	43	2	Rektum	-	-	-	-	07.06.2010	-	-	2	2
9	E	34	1	Rektum	+	-	-	-	18.09.1997	-	2001	4	4
10	E	47	1	Rektum	-	-	-	-	18.05.2010	-	-	2	2
11	K	38	2	Kolon	-	-	-	-	10.12.2010	-	-	2	2
12	K	33	2	Kolon	-	-	-	-	01.04.2009	2011	-	2	3
13	E	36	2	Kolon	-	-	+	-	02.01.2009	2010	-	1	3
14	K	33	2	Kolon	-	-	-	-	23.03.2010	-	-	1	2
15	E	36	2	Kolon	-	-	+	-	20.10.1997	1999	2002	2	5
16	E	30	2	Kolon	-	-	+	+	1992	1996	2000	4	8
17	K	32	2	Rektum	-	-	+	+	24.11.1996	2010	2010	14	14
18	E	41	2	Rektum	-	-	-	+	01.05.2009	2011	-	2	1
19	E	35	2	Rektum	+	-	-	-	01.06.2010	-	-	2	2
20	E	38	2	Rektum	-	+	-	+	02.11.2007	2009	2009	2	2
21	E	28	3	Kolon	-	+	+	+	19.01.1998	2004	2004	6	6
22	E	44	3	Kolon	-	+	+	-	26.07.2010	2009	2011	0,25	0,25
23	K	39	3	Kolon	-	+	-	+	2005	2009	-	4	7
24	E	28	3	Kolon	-	+	-	-	22.11.2010	-	-	2	2
25	K	41	3	Rektum	-	+	-	-	25.10.2009	-	-	3	3
26	K	47	3	Rektum	-	+	+	-	27.08.2008	2009	-	1	4
27	K	35	3	Rektum	-	-	-	-	27.03.1997		UN	UN	UN
28	K	30	3	Rektum	-	+	-	-	30.06.1995	-	-	17	17
29	K	30	3	Rektum	-	+	-	-	13.01.1995	-	-	17	17
30	K	33	3	Rektum	+	+	-	-	20.05.1997	-	-	15	15
31	E	33	3	Rektum	+	+	-	-	09.12.2010	-	-	2	2
32	E	37	4	Kolon	-	-	+	-	19.11.2009	2009	-	0,1	3
33	K	43	4	Kolon	-	-	+	-	28.12.2009	2009	-	0,1	3
34	E	45	4	Kolon	-	+	+	-	31.01.2008	2008	2011	0,1	3
35	K	46	4	Kolon	-	-	+	-	12.12.2010	2010	-	0,1	2
36	E	34	4	Rektum	+	-	+	-	25.11.1996	1996	1997	0,1	1
37	E	35	4	Rektum	+	-	+	-	24.09.2009	2009	2011	0,1	2
38	E	44	4	Rektum	-	+	-	-	19.09.2010	-	-	2	2
39	E	48	4	Rektum	-	+	+	-	08.03.2011	2011	-	0,1	1
40	E	33	2	Rektum	-	+	+	-	23.02.2011	2011	2011	0,5	0,5

3.2. Gereçler

3.2.1. Kullanılan Aletler

- PCR (GeneAMP 9700) (USA)
- LightCycler 480II (Roche Diagnostics, USA)
- Isıtıcı blok (DB-2A) (Techne, England)
- Su banyosu (BM 302) (Nüve, İstanbul, Turkey)
- Santrifüj (Z-23), (Hermle, Germany)
- Santrifüj (22R) (Beckman Coulter, Germany)
- Plate santrifüjü (Thermo, USA)
- Manyetik Karıştırıcı (Vorteks) (Velp Scientifica, Italy)
- + 4°C Buzdolabı (Alaska, İstanbul, Turkey)
- - 20°C Buzdolabı (Bosch, İstanbul, Turkey)
- - 80°C Buzdolabı (Nüve, İstanbul, Turkey)
- PCR UV kabini (Biosan, Latvia)
- Nanodrop (2000) (Thermo, USA)

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- RNeasy FFPE kiti (50 örneklik) (Qiagen, USA)
- Biostic Paraffin Removal Reagent (MO BIO, USA)
- RT² Profiller PCR Array (SABioscience, USA)
- RT² miRNA First Strand Kiti (Qiagen, USA)
- RT² SYBR Green Mastermix Kiti (SABioscience, USA)
- Etanol (Merck, Germany)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Parafinize Edilmiş Doku Örneklerinden RNA Elde Edilmesi

Ameliyat sonrası çıkartılarak formalin ile fiske edilip parafin içerisine gömdürülen ve Patalog tarafından değerlendirilen dokular çalışmaya dahil edildi. Normal ve tümör doku olarak tanımlanmış hastaya ait parafin blok için ependorf tüpler oluşturuldu ve parafin bloklardan 0.2-0.4 cm kesilerek bu ependorflar içerisine alındı. Materyaller, BIOstic (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) ile 2 kez muamele edilerek parafinden arındırıldı. BIOstic ile doku üzerindeki parafin çözdürüldükten sonra materyaller, %100-%70 ve %40' lık alkol aşamalarından geçirildi ve alkol oda ısısında uçuruldu. Bu aşamalardan sonra 40 hastaya ait tümör doku ve 8 hastaya ait normal dokudan, parafin bloktan RNA izolasyonuna uygun ticari kit (Qiagen RNeasy FFPE kit) kullanılarak prosedüre uygun şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.3.2. Elde Edilen RNA' ların Miktar ve Kalite Tayini

Elde edilen RNA' ların miktarı ve kalitesi NanoDrop 2000 Spektrometre (Thermo scientific, Wilmington, DE, USA) cihazı kullanılarak ölçüldü (Tablo-3).

Tablo-3 Hastalara Ait Örneklerin RNA Konsantrasyonları ile İlgili Nanodrop Ölçümleri

Örnek ID	Nükleik Asit kons.	Ünite	A260	A280	260/280	Örnek tipi	Faktör
1	883,1	ng/µl	22,077	11,542	1,91	RNA	40
2	13,1	ng/µl	0,327	0,184	1,78	RNA	40
3	52,3	ng/µl	1,307	0,682	1,91	RNA	40
4	151,2	ng/µl	3,779	2,069	1,83	RNA	40
5	56,9	ng/µl	1,423	0,733	1,94	RNA	40
6	485,6	ng/µl	12,141	6,370	1,91	RNA	40
7	526,5	ng/µl	13,161	6,818	1,93	RNA	40
8	218,2	ng/µl	5,455	2,826	1,93	RNA	40
9	16,9	ng/µl	0,422	0,255	1,65	RNA	40
10	2135	ng/µl	53,375	28,862	1,85	RNA	40
11	304,8	ng/µl	7,621	4,278	1,78	RNA	40
12	28,2	ng/µl	0,563	0,315	1,78	RNA	40
13	32,2	ng/µl	0,643	0,327	1,97	RNA	40
14	48,8	ng/µl	0,977	0,493	1,98	RNA	40
15	24,7	ng/µl	0,494	0,303	1,63	RNA	40
16	23,5	ng/µl	0,588	0,314	1,88	RNA	40
17	49	ng/µl	1,225	0,651	1,88	RNA	40
18	177,5	ng/µl	4,436	2,272	1,95	RNA	40
19	119,8	ng/µl	2,396	1,243	1,93	RNA	40
20	16,4	ng/µl	0,327	0,173	1,89	RNA	40
21	82,9	ng/µl	2,073	1,109	1,87	RNA	40
22	171,4	ng/µl	4,285	2,17	1,97	RNA	40
23	153,1	ng/µl	3,827	2,2	1,74	RNA	40
24	26,6	ng/µl	0,665	0,379	1,75	RNA	40
25	13,9	ng/µl	0,349	0,188	1,85	RNA	40
26	119,2	ng/µl	2,979	1,581	1,88	RNA	40
27	90,7	ng/µl	2,268	1,205	1,88	RNA	40
28	17,2	ng/µl	0,429	0,221	1,94	RNA	40
29	224,9	ng/µl	5,622	2,991	1,88	RNA	40
30	29,2	ng/µl	0,729	0,414	1,76	RNA	40
31	86,3	ng/µl	2,158	1,124	1,92	RNA	40
32	12,9	ng/µl	0,323	0,189	1,71	RNA	40
33	110,2	ng/µl	2,756	1,412	1,95	RNA	40
34	45,3	ng/µl	1,131	0,581	1,95	RNA	40
35	22,4	ng/µl	0,56	0,297	1,89	RNA	40
36	177,2	ng/µl	4,431	2,365	1,87	RNA	40
37	81,8	ng/µl	2,045	1,193	1,71	RNA	40
38	136,5	ng/µl	3,414	1,777	1,92	RNA	40
39	100	ng/µl	2,5	1,422	1,76	RNA	40
40	45,3	ng/µl	1,131	0,581	1,95	RNA	40

RNA örneklerinin 260 ve 280 nm' deki dalga boylarında yapılan ölçümleri ve bu dalga boylarından elde edilen değerlerin birbirlerine olan oranları, miktar ve kalite konusunda bilgi verdi.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 260 nm' de ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin ng/μL veya μg/mL düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır. RNA' nın konsantrasyonunun saptanmasında kullanılan spektrofotometrik yöntemler DNA' nın spektral analizi ile tamamen aynıdır. Sadece tek zincirli RNA' nın miktarının belirlenmesinde kullanılan formül farklıdır.

$$\text{Total RNA (ng/}\mu\text{l)} = 260 \text{ nm' deki absorbans} \times 40 \times \text{Dilüsyon Faktörü}$$

RNA molekülleri için 1 optik dansitenin 40 μg/mL' ye karşılık geldiği bilinmektedir. Bununla birlikte 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Proteinlerde bilindiği gibi 280 nm' de absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu nedenle 280 nm' de ölçülen bir değerdeki artış A260/A280 oranında düşmeye neden olur. İzole edilen total RNA örneklerinin saflığından bahsetmek için bu oran 1.8-2.00 arasında olmalıdır.

3.3.3. RNA' lardan cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA' nın 5 ng' ından RT² miRNA First Stand Kit MA03 (QIAGEN, Germantown, Maryland, USA) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) elde edildi. İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için kullanılan PCR karışımı ve programı Tablo-4 ve Tablo-5' te verildi.

Tablo-4 cDNA Sentezi için Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	1 Örneklik Reaksiyon
RNA	50 ng-200 ng (0.5 ng– 2 μg RNA)
miRNA RT Primer & ERC Miksi (M1)	1.0 μL
5X miRNA RT Buffer 2 (M5)	2.0 μL
miRNA RT Enzim Miksi (M3)	2.0 μL
Nükleotid Miksi	1.0 μL
RNase-free H ₂ O	Toplam hacim 10.0 μL olacak şekilde dH ₂ O ile tamamlanır

Tablo-5 cDNA sentezi için kullanılan PCR Programı

PCR Programı
16 °C'de → 30 dakika
42 °C' de → 30 dakika
85 °C' de → 5 dakika
4 °C'de → ∞

Çalışılması hedeflenen her bir örnek için 0,2 µl' lik PCR tüpü içerisine Tablo-5' te verilen malzemelerden reaksiyon karışımı oluşturuldu. Elde edilen miks pipetaj yapılarak karıştırıldı ve santrifüje alınarak spin atıldı. PCR tüpü içerisindeki miks, 37°C' de 2 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen cDNA' lar üzerine reaksiyon karışımı bulunan her bir PCR tüpüne 90 µl dH₂O ilave edilerek karıştırıldı ve ürünler bir sonraki aşamaya kadar -20°C' de saklandı.

3.3.4. Real-Time PCR ile miRNA Expresyon Analizleri

Çalışmada, Kolorektal kanser gelişiminde diagnostik ve prognostik öneme sahip, aynı zamanda ilaç direnci üzerine etkisi belirlenen miRNA' ların değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen miRNA' lar bu amaç doğrultusunda yapılan literatür araştırması sonucu belirlendi. Seçilen 38 farklı miRNA' nın tümör dokularındaki ekspresyon durumları, kromozomal lokalizasyonları ve hedef genleri ile ilgili bilgiler Tablo-6' da verildi.

Tablo-6 Kolorektal Kanser Gelişiminde Diagnostik, Prognostik ve İlaç Direnci ile İlişkili miRNA' lar ve özellikleri (50-62)

miRNA Adı	miRNA Accession numarası	Ekspresyon Durumları	Kromozom Lokalizasyonları	Hedef Genleri
hsa-miR-21	MIMAT0000076	↑	17q23.1	<i>PDCD4, PTEN, RECK, NFIB, TPM1, SPRY2, RHOB, TIMP3, maspin, CDC25a, TIAM1, MSH2</i>
hsa-miR-143	MIMAT0000435	↓	5q32	<i>KRAS, DNMT3A, ERK5</i>
hsa-miR-145	MIMAT0000437	↓	5q32	<i>IRS-1, c-Myc, YES1, STAT1, OCT4,</i>
hsa-miR-19a	MIMAT0000073	↑	13q31.3	<i>MYC, PTEN</i>
hsa-let-7a	MIMAT0000062	↓	13	<i>c-MYC, DLD-1, Ras</i>
hsa-let-7b	MIMAT0000063	↑	22	<i>MYC, PTEN, BRCA1, NRAS</i>
hsa-let-7c	MIMAT0000064	↓	21	<i>E2F3, DICER1, KRAS, MYC</i>
hsa-miR-17	MIMAT0000070	↑	13q31.3	<i>THBS1, c-MYC, CDKN1A, E2F1</i>
hsa-miR-155	MIMAT0000646	↑	21	<i>MLH1, MSH2, MSH6</i>
hsa-miR-29b	MIMAT0000100		1q32.2	<i>IGF1, PTEN, IL4</i>
hsa-miR-106a	MIMAT0000103	↑	Xq26.2	<i>PTEN, E2F1, RB1</i>
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250		11	<i>PTEN, CD44</i>
hsa-miR-191	MIMAT0000440	↓	3p21.31	<i>DICER1, NRAS</i>
hsa-miR-221	MIMAT0000278	↑	X	<i>AKT1, PTEN</i>
hsa-miR-223	MIMAT0000280	↑	Xq12	<i>SOX2, E2F1</i>
hsa-miR-148a	MIMAT0000243	↑	7	<i>IL6, CD44</i>
hsa-miR-200a*	MIMAT0001620	↑	1	<i>MAP3K10, ZEB1, MET, MYC, PTEN</i>
hsa-miR-15b	MIMAT0000417	↓	3	<i>CD44, EIF5</i>
hsa-miR-15a	MIMAT0000068	↑	13	<i>RB1, IL3, TP53</i>
hsa-miR-16	MIMAT0000069		13q14.2	<i>E2F1, PIK3CA</i>
hsa-miR-181b	MIMAT0000257	↑	9q33.3	<i>PTEN, TNS3, E2F5, GATA6, ELF5</i>
hsa-miR-200c	MIMAT0000617	↑	12p13.31	<i>ZEB1, ZEB2</i>
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552		11q13.4	<i>c-MYC, CD44</i>
hsa-miR-26a	MIMAT0000082	↑	3p21.31	<i>CDKN1A, IL6, MAP2</i>
hsa-miR-27a	MIMAT0000084	↓	19	<i>PTEN, TP53</i>
hsa-miR-30a	MIMAT0000087	↑	6q13	<i>DTL</i>
hsa-miR-34a	MIMAT0000255		1q36.22	<i>FRA1, SIRT1, MYC, BCL2</i>
hsa-miR-96	MIMAT0000095	↑	7q32.2	<i>KRAS</i>
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	↓	6	<i>c-MET</i>
hsa-miR-135b	MIMAT0000758	↑	1q32.1	<i>MSH2</i>
hsa-miR-125b	MIMAT0000423	↓	11q23	<i>TP53, AKT1, E2F1</i>
hsa-miR-137	MIMAT0000429	↓	1p22	<i>Cdc42, LSD-1</i>
hsa-miR-20a	MIMAT0000075	↑	13q31.3	<i>PDCD4, PTEN, RECK, NFIB, TPM1</i>
hsa-miR-99a	MIMAT0000097		21q21.1	<i>CCND1, DICER1, IGF1, c-MYC</i>
hsa-miR-498	MIMAT0002824		19q13.41	<i>MAX, FAF1, CD4</i>
hsa-miR-320	MIMAT0000510	↓	8	<i>CD71, POUR3D</i>
hsa-miR-183	MIMAT0000261	↑	7q32.2	<i>SOX2, KLF4</i>
hsa-miR-124	MIMAT0000422	↓	8	<i>AKT1, MAP14, E2F5</i>

Nükleik asit ekspresyon analizleri için oluşturulmuş en güncel ve güvenilir düzeneklerden biri olan RT² miRNA PCR Array, real-time PCR, revers transkripsiyon PCR ya da qRT-PCR kullanılarak yüzlerce miRNA' nın ekspresyonlarını analiz etmek için dizayn edilen bir plate sistemidir. Çalışmamızda kullanılmak üzere belirlediğimiz genler için dizayn ettirilmiş olan her biri 384 kuyucuklu PCR array 8 farklı örneğin değerlendirilmesine uygun olarak düzenlendi. PCR arraylar içerisinde, 8 farklı her bir örnek için 3 adet PCR array kontrolü (miRTC, PPC, U6), 3 adet housekeeping gen (SNORD44, SNORD47, SNORD48) ve 42 miRNA (38 farklı, 4 tanesi 2 tekrar olacak şekilde) yer almaktaydı (Tablo-7).

RT² SYBR Green qPCR Master Mixes (Qiagen-USA) kiti kullanılarak Real-time PCR reaksiyonunda SYBR® Green'in floresan özelliğinden yararlanıldı. SYBR Green boyası çift sarmal DNA'nın küçük girintisine bağlanarak az miktarda floresans yaymakta ve daha sonraki bilgisayar analizleri için gerekli olan floresans sinyalinin oluşturmaktadır. Çoğaltılmış hedef cDNA'ya bağlanan SYBR Green boyası ile elde edilen erime eğrisi sayesinde spesifik hedef cDNA'nın varlığı analiz edilmektedir (Şekil-11).

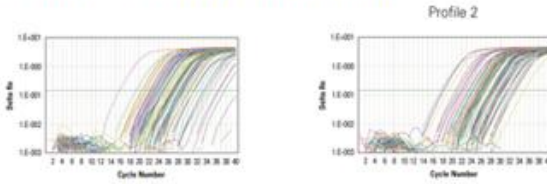
1. Total RNA'dan cDNA Eldesi



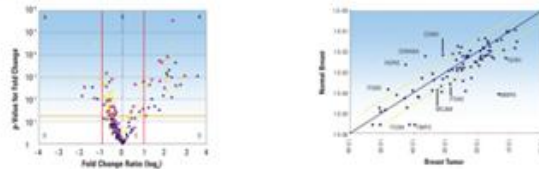
2. RT² qPCR Master Miksinin Hazırlanması ve Her Kuyuya cDNA Eklenmesi



3. Real-Time PCR Cihazında Programın Başlatılması



4. Verilerin Analiz Edilmesi

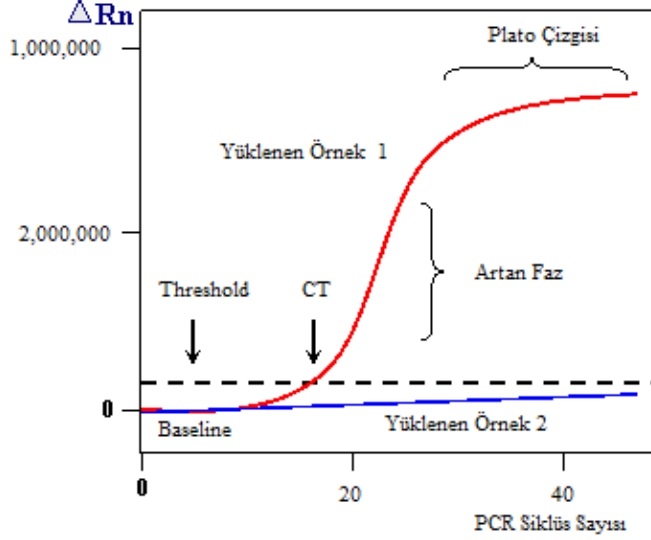


Şekil-11 RNA'dan Verilerin Analiz Edilmesine Kadar Gerçekleştirilen Aşamalar

MiRNA ekspresyonlarının Ct değerleri, Lighy Cyclers480II cihazının veri tabanından yararlanılarak elde edildi. Eşik değeri (Threshold) olarak tanımlanan CT değeri, floresan ışımada (ΔR_n) artışın başladığı ilk siklusu ifade eder. $R_n(+)$, yüklenen örneğin reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu, $R_n(-)$ ise negatif kontrolün ve reaksiyonu gerçekleşmeyen örneklerin floresan emisyonu olarak tanımlanmaktadır. ΔR_n , $R_n(+)$ ve $R_n(-)$ arasındaki fark olup, CT değerinin hesaplanmasında kullanılan temel göstergedir. Çalışmada, SNORD46, SNORD47 ve SNORD48'in ortalama Ct değerleri belirlenerek PCR Array'den elde edilen verilerin normalizasyonu yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analiz

miRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimleri inceleyebilmek için öncelikle LightCycler 480 II cihazının veri tabandan, yüklenen örneklerin Row Data ve CT değerleri elde edildi (Şekil-11).



Şekil-12 Lightcycler LC 480 II Cihazında Örneklerin Ct Değerlerinin Elde Edilmesi

Hastalar, klinik özelliklerine göre gruplara ayrıldı ve Sabioscience sitesinde yer alan PCR Array Veri Analizi sayfasına yüklendi (<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Evre1-2 tümörleri grup1, evre 3 tümörleri grup2, evre 4 tümörleri grup 3 ve normal dokudan elde edilen örnekler ise kontrol grubu olarak sınıflandırılarak istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

Web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak, evreler arasında miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden kat değişimi (fold change) grafikleri ve değerlendirilen gruplara göre miRNA'ların hangilerinin yüksek eksprese (up-regüle) hangilerinin düşük eksprese (down-regüle) olduğunu gösteren Clustrogram görüntüsü oluşturuldu. Sabiosciences PCR-Data Analiz sisteminde 2' deltact değerlerinden Student T testi yapılarak her bir miRNA'nın p değeri belirlendi. Sonuçlar % 95' lik güven aralığında ve anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi. miRNA ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların, hastaların klinik özellikleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymak için ise Sabiosciences PCR-Data analiz programından yararlanıldı.

İlk tanı ile hastalığın ilk yinelemesi arasında geçen süre hastalısız sağkalım, ilk tanı ile ölüm tarihi arasında geçen süre genel sağkalım süresi olarak hesaplandı. Takip süresi ilk tanı tarihi ile son kontrol veya ölüm tarihi arasındaki süreler dikkate alınarak belirlendi. miRNA

ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım süreleri ile hastaların almış olduğu tedaviler üzerine önemliliklerinin incelenmesi için MedCalc programına ait Kaplan Meier Analizi uygulandı.

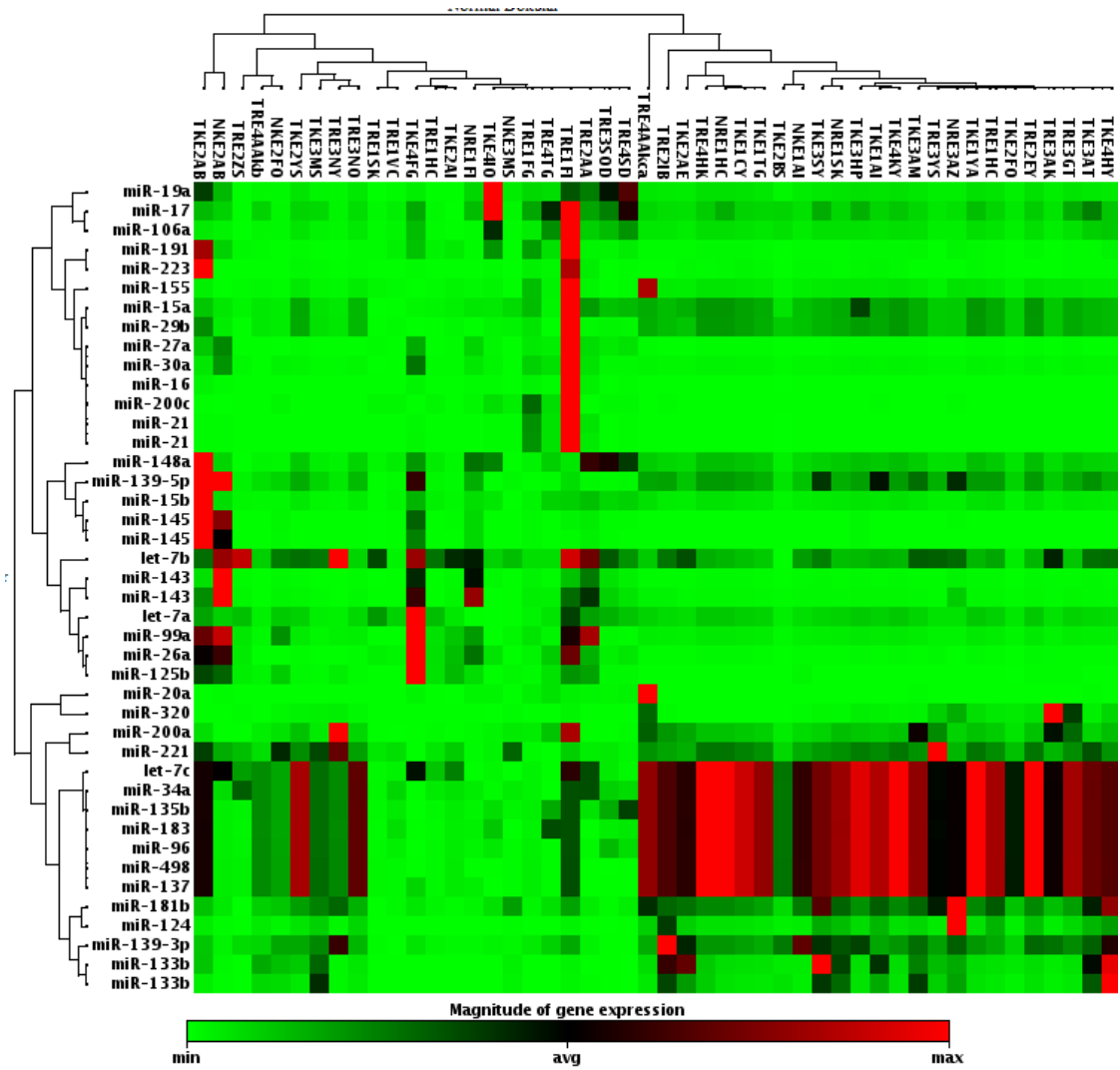
4. BULGULAR

Çalışmamızda, 2005-2011 yılları arasında kolorektal kanser tanısı almış, operasyon öncesi radyoterapi ya da kemoterapi almamış, 50 yaş altı, 40 hasta değerlendirildi. Hastaların yaş aralığı 18-48 arasında olup ortalama yaş 36 olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen hastaların 23' ü erkek, 17' si kadındır. 18 vakada primer tümörün rektumda, 22 vakada ise kolonda lokalize olduğu saptandı. Kırk hastanın yedisinde müsinöz komponent varlığı belirlendi. 15 hastada lenf nodu metastazı belirlendi. Seçilen hastalar en az iki yıl takibe alındı ve 19 hastada ise uzak metastaz ya da nüks varlığı gözlemlendi. Değerlendirilen hastaların klinik ve patolojik özellikleri Tablo 8' de verilmektedir.

Tablo-8 Hastalara Ait Klinik Özellikler

Değerlendirilen parametreler	Hasta Sayısı (%)
Hasta	40
Yaş	
18-29	3(7.5)
30-39	23(57.5)
40-48	14(35)
Cinsiyet	
Kadın	17 (42.7)
Erkek	23 (57.3)
Tümör Büyüklüğü	
<3	14 (35)
≥3	26 (65)
Müsinöz Komponent Varlığı	
Yok	33 (82.5)
Var	7 (17.5)
Tümör Lokalisasyonu	
Kolon	18 (45)
Rektum	22 (55)
Evre	
I	10 (25)
II	10 (25)
III	9 (22.5)
IV	11 (27.5)
Nüks ve Uzak Metastaz Varlığı	
Yok	19 (47.5)
Var	21 (57.5)
Lenf Nodu Metastaz Varlığı	
Var	15 (37.5)
Yok	25(62.5)

Real-time PCR Array sistemleri kullanılarak, 40 kolorektal tümörde 38 farklı miRNA' nın ekspresyon profilleri analiz edildi. İlk olarak tümör dokudaki miRNA ekspresyon seviyeleri normal dokudaki ekspresyon seviyeleri ile, web tabanlı Sabiosciences PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanılarak karşılaştırıldı ve istatistiki değerler bu programda yer alan Student T testi ile elde edildi (Şekil-13)



Şekil-13 Belirlenen Hasta Grubunda Değerlendirilen miRNA' ların Clustergram Görüntüleri

Tümör ve normal dokulardaki miRNA ekspresyon profilleri karşılaştırıldığında, 17 miRNA' nın ekspresyon seviyelerinde, bu iki grup arasında farklılıklar olduğu belirlendi. 12 miRNA' nın (miR-200a, miR-20a, miR-15a, miR-183, miR-21, miR-17, miR-155,

miR-106a, miR-96, miR-135b, miR-223 ve miR-148a) ekspresyon seviyesinin tümör dokularında normal dokulara göre artış gösterdiği, 5 miRNA' nın (miR-143, miR-145, miR-125b, miR-124 ve miR-133b) ekspresyon seviyelerinin ise tümör dokularında normal dokulara göre azalma gösterdiği belirlendi. Bu miRNA' lar arasında miR-143' ün düşük ekspresyon seviyesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde değerlendirildi ($p= 0.01$) (Tablo-9).

Tablo-9 Tümör Doku ve Normal Dokuda miRNA Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

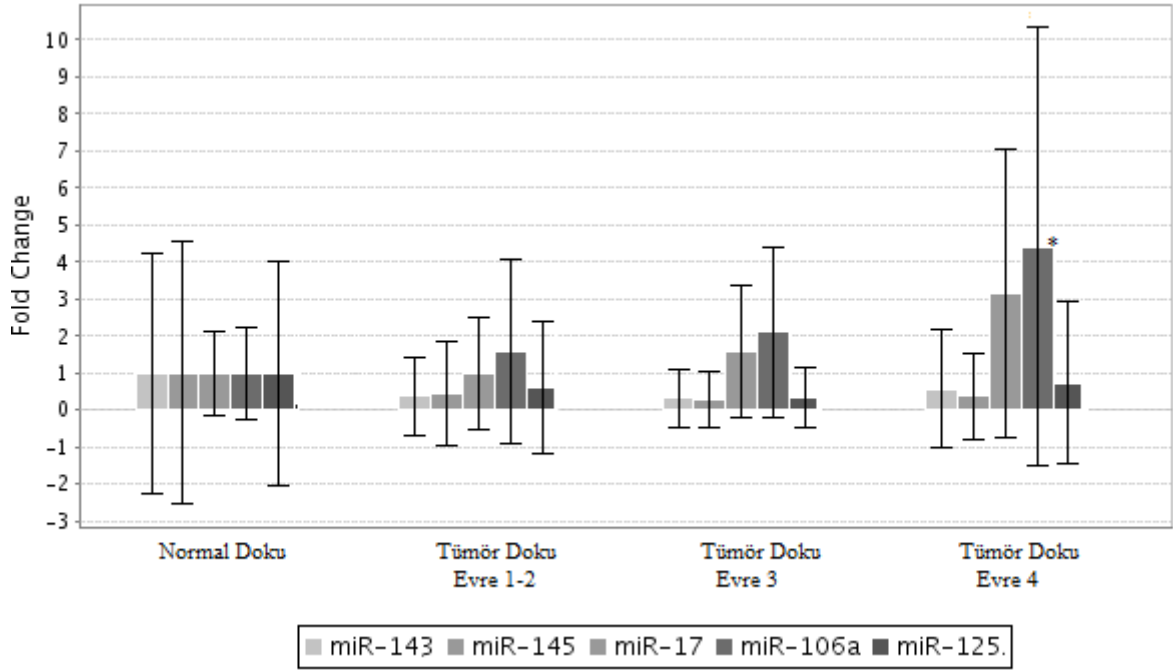
miRNA	Normal Doku	Tümör Doku		
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p Değeri
miR-96	0.149	0.227	1.514	0.541
miR-223	1.892	6.487	3.428	0.503
miR-21	7.707	13.746	1.783	0.580
miR-200a	0.337	0.464	1.37	0.274
miR-20a	0.929	1.102	1.71	0.636
miR-183	0.149	0.251	1.676	0.50
miR-17	0.609	0.891	1.4621	0.297
miR-155	0.301	0.564	1.8735	0.478
miR-15a	0.416	0.463	1.111	0.449
miR-148a	0.533	0.677	1.269	0.530
miR-145	5.296	2.007	0.379	0.318
miR-143	2.297	0.917	0.399	0.011
miR-135b	0.170	0.271	1.597	0.471
miR-133b	0.527	0.346	0.656	0.734
miR-125b	9.334	5.056	0.541	0.904
miR-124	0.465	0.332	0.714	0.104
miR-106a	0.353	0.760	2.153	0.303

Normal kolon mukozası ile evrelere ayrılarak gruplanan tümör dokular karşılaştırılarak miRNA' ların ekspresyon seviyeleri incelendi. Histopatolojik evreleme sistemine göre tümör dokular 3 gruba ayrılarak değerlendirildi. Evre1-2 tümörleri grup 1, evre 3 tümörleri grup 2 ve evre 4 tümörleri de grup 3 olarak tanımlandı. Normal dokular ise kontrol grup olarak alındı. Evreler arasında miRNA ekspresyon düzeylerindeki değişimler web tabanlı PCR-Data Analiz programından yararlanılarak belirlendi. Farklı evrelere ait kolorektal tümörlerin normal doku ile karşılaştırılması sonucu miR-17, miR-145, miR-143, miR-125b ve mR-106a' nın ekspresyon seviyelerinde ki farklılıkların diğer miRNA' lardan daha fazla olduğu belirlendi (Tablo-10).

Tablo-10 Normal Doku ile Evre 1-2, Evre 3 ve Evre 4' ün Karşılaştırılması ile Farklılık Belirlenen miRNA' ların Ct Değerleri, P Değerleri ve Değişim Oranları

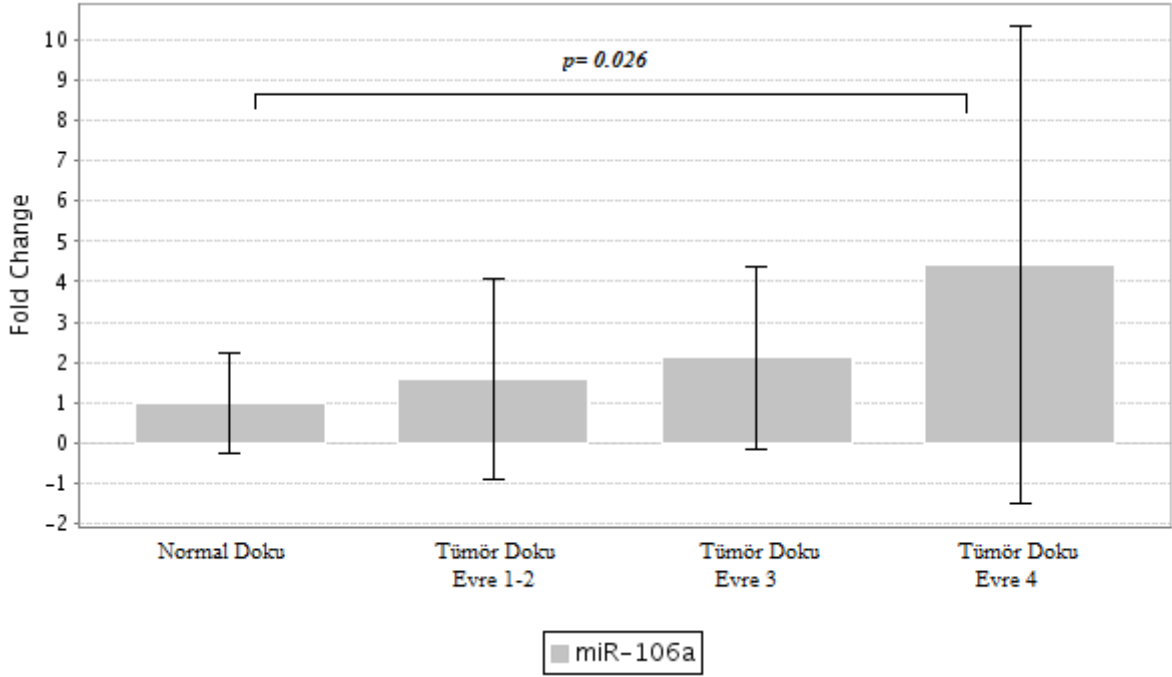
miRNA	Normal Doku	Tümör Doku Evre 1-2			Tümör Doku Evre 3			Tümör Doku Evre 4		
	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p Değeri	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p Değeri	2 ⁻ (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p Değeri
miR-17	0.609	0.603	0.989	0.558	0.96	1.585	0.188	1.925	3.158	0.074
miR-145	5.296	2.369	0.448	0.596	1.487	0.280	0.203	2.004	0.378	0.461
miR-143	2.618	0.947	0.361	0.064	0.704	0.268	0.079	0.629	0.240	0.312
miR-125b	9.334	5.703	0.611	0.783	3.175	0.340	0.092	6.835	0.732	0.631
miR-106a	0.353	0.558	1.578	0.454	0.745	2.110	0.083	1.555	4.403	0.026

Erken yaş hastalarda sporadik gelişen kolorektal tümörlerde miR-17 ve miR-106a' nın ekspresyon seviyelerindeki artışın ve miR-125b, miR-143 ve miR-145' nin ekspresyon seviyelerindeki düşüşün evreler arasında farklılıklar gösterdiği belirlendi (Şekil-14).



Şekil-14 Kolorektal Kanser Tümör Dokularının Normal Dokular ile Karşılaştırılması Sonucunda Evre 1-2, Evre 3 ve Evre 4 Arasında Farklılıkları Belirlenen 5 miRNA' nın Ekspresyon Seviyeleri. (*; $p < 0.05$)

Değerlendirilen miRNA' lardan miR-106a' nın ekspresyon seviyesi geç evre olarak tanımlanan ve uzak metastaz varlığı ile karakterize edilen evre 4 tümörlerde 4.4 kat artarak istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi ($p = 0.02$) (Şekil-15).



Şekil-15 Kolorektal Kanser Tümör Dokularının Normal Dokular ile Karşılaştırılması Sonucunda Evre 1-2, Evre 3 ve Evre 4 Arasında İstatistiki Olarak Anlamlılık Gösteren miR-106a' nın Ekspresyon Seviyesi ($p= 0.026$)

Farklı evrelere ait tümör dokular birbirleri ile karşılaştırıldığında miR-106a' nın evre 4 tümörlerde, diğer tüm evrelere göre artış gösterdiği belirlendi. Evre 3 ve evre 4 arasındaki farklılık istatistiki olarak anlamlı olarak değerlendirildi ($p=0.04$) (Tablo-11).

Tablo-11 Farklı Histolojik Evrelere Ait Tümör Dokularında miRNA Ekspresyon Seviyelerinin Birbirleri ile Karşılaştırılması Sonucunda Elde Edilen Değerler

miRNA	Evre 1-2 ve Evre 3		Evre 1-2 ve Evre 4		Evre 3 ve Evre 4	
	Kat Değişimi	p-Değeri	Kat Değişimi	p-Değeri	Kat Değişimi	p-Değeri
miR-17	1.6	0.986	3.194	0.096	1.991	0.096
miR-145	-1.59	0.447	-1.125	0.749	1.348	0.296
miR-143	-1.15	0.371	-1.504	0.626	1.772	0.291
mR-125b	-1.8	0.148	1.198	0.375	2.153	0.260
miR-106a	1.34	0.610	2.789	0.503	2.087	0.040

Normal dokular ile karşılaştırıldığında genç yaşta, sporadik olarak gelişen tümör dokularında ekspresyonlarında farklılıklar gözlenen 5 miRNA' nın hedef genleri web tabanlı miRWalk programı (http://www.umm.uni_heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/) kullanılarak belirlendi. Etkili olduğu sinyal yolları ise KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) ve BioCarta (<http://www.biocarta.com/>) veritabanlarından yararlanılarak tespit edildi. Tablo-

12' de miRNA' ların hedef genleri, Tablo 13' de ise miRNA' ların etkili olduğu sinyal yolları ve bu yollarda görev alan temel genler verildi.

Tablo-12 miR-17, miR-106a, miR-125b, miR-143 ve miR-145' in miRWALK Programına Göre Hedef Aldıkları Genler

miRNA	Hedef Genler
Tümör Baskılayıcı miRNA' lar	
miR-143	AKT1, APC, BCL2, CCND1, FOS, JUN, KRAS, LEF1, MAPK3, MYC, PIK3CA, TGFBR2, TP53
miR-145	AKT1, BCL2, CCND1, CTNNB1, EGFR, IGF1R, JUN, KRAS, LEF1, MAPK3, MYC, PIK3CA, SMAD2, SMAD3, SMAD4, TGFBR2, TP53
miR-125b	AKT1, BAX, BCL2, CCND1, JUN, KRAS, MAPK3, MYC, TP53
OnkomiRNA' lar	
miR-106a	TGFBR2, MYC, TP53
miR-17	APC, AKT, FOS

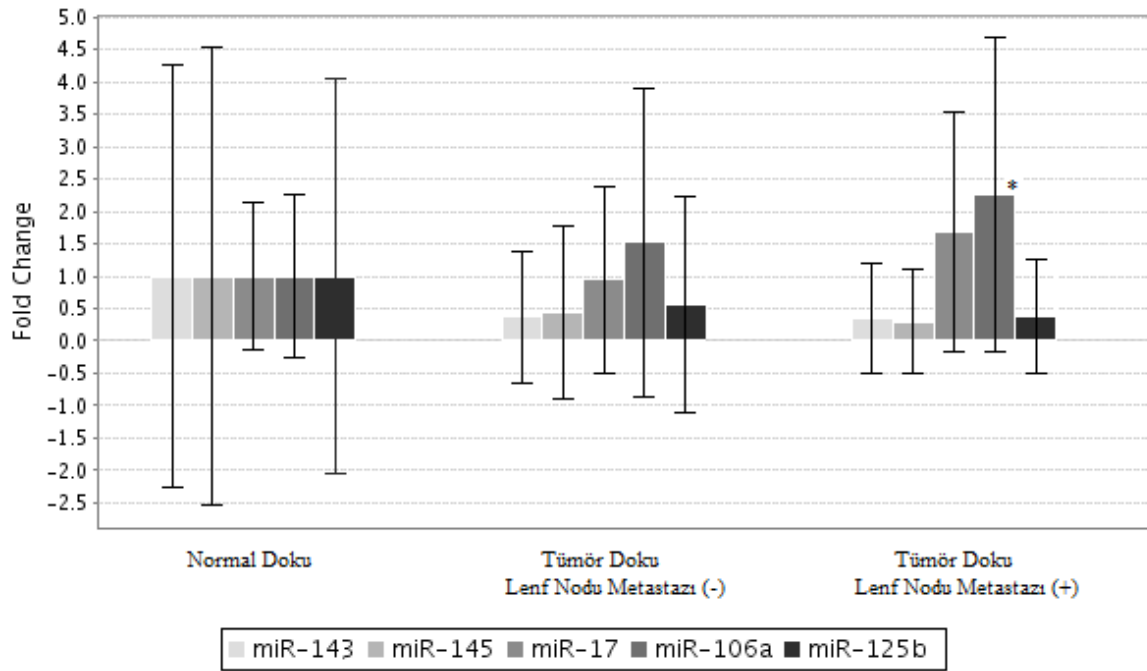
Tablo-13 miR-17, miR-106a, miR-125b, miR-143 ve miR-145' in, KEGG ve BioCarta veritabanlarına Göre Etkili Oldukları Sinyal Yolları ve Bu yollardaki Önemli Genler

miRNA	Sinyal Yolağı	Database	Gen Adı
miR-143 ve miR-145	Apoptoz	KEGG	TNF
	Hücre Adezyon Molekülleri	KEGG	SDC1, CD8A
	Hücre Siklusu	KEGG	CDK2N1A, RB1, E2F1
	Sitokin-sitokin Reseptör Bağlantısı	KEGG	TNF, CSF1, VEGFA, TGFBR2, IL10
	JAK/STAT Yolağı	KEGG	STAT3, MYC, IL10
	P53 Sinyal Yolağı	KEGG	CDK2N1A, PTEN
	WNT Sinyal Yolağı	KEGG	MYC
	VEGF Sinyal Yolağı	KEGG	VEGFA
	G1 Yolağı	Biocarta	CDK2N1A, RB1, E2F1
	IL10 Yolağı	Biocarta	IL10, TNF, STAT3
miR-17	TNFR1 Yolağı	Biocarta	TNF, RB1
	Apoptoz	KEGG	TNF
	Hücre Adezyon Molekülleri	KEGG	SDC1, CD8A
	Hücre Siklusu	KEGG	CDK2N1A, RB1, E2F1
	JAK/STAT Yolağı	KEGG	STAT3, MYC, IL10
miR-106	G1 Yolağı	Biocarta	CDK2N1A, RB1, E2F1
	WNT Sinyal Yolağı	KEGG	MYC
	VEGF Sinyal Yolağı	KEGG	VEGFA
	Hücre Adezyon Molekülleri	KEGG	SDC1, CD8A
miR-125b	P53 Sinyal Yolağı	KEGG	CDK2N1A, PTEN
	Apoptoz	KEGG	TNF

Lenf nodu metastaz varlığına göre hastalar değerlendirildiğinde lenf nodu metastazı negatif hastalar ile lenf nodu metastazı pozitif hastalar belirlenerek normal dokuyla ve birbirleriyle istatistiki olarak karşılaştırıldı (Tablo-14 ve Şekil-16).

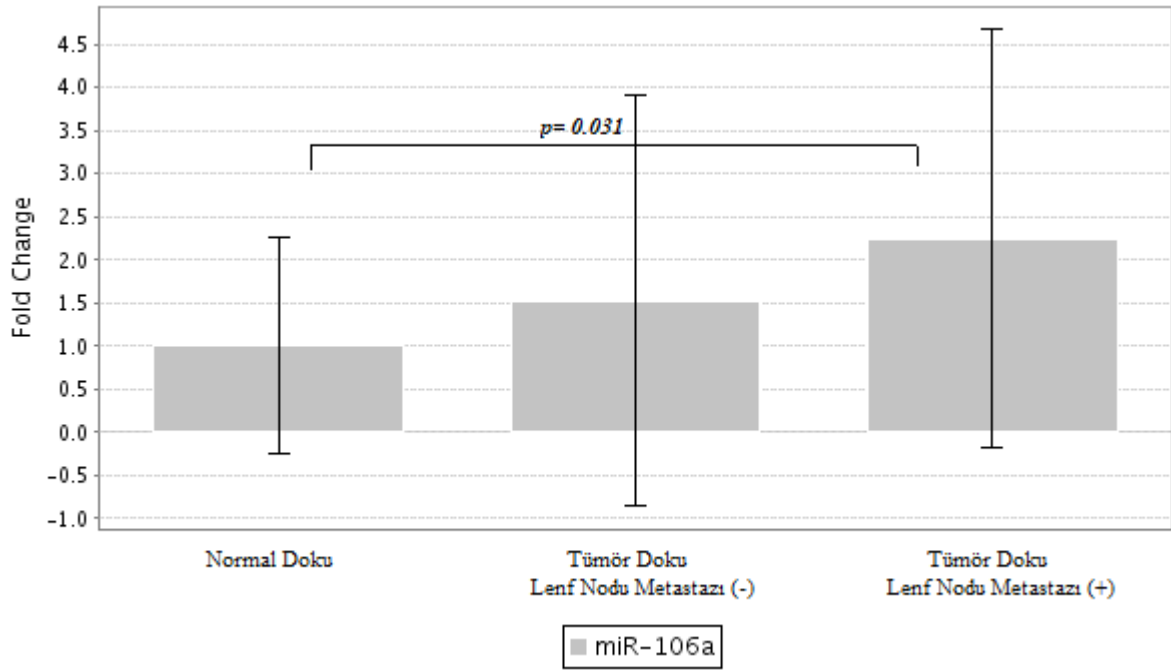
Tablo-14 Lenf Nodu Metastazı Durumunun Normal Doku ile Karşılaştırılması ile Elde Edilen Değerler

miRNA	Normal Doku	Tümör dokuda lenf nodu metastaz (-)			Tümör dokuda lenf nodu metastaz (+)		
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p-değeri	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p-değeri
miR-17	0.609	0.719	1.180	0.415	1.273	2.088	0.096
miR-145	5.296	2.398	0.452	0.572	1.492	0.281	0.133
miR-143	2.297	0.944	0.411	0.064	0.874	0.380	0.066
miR-125b	9.334	5.948	0.637	0.805	3.858	0.413	0.063
miR-106a	0.353	0.632	1.790	0.369	1.035	2.929	0.032



Şekil-16 Belirlenen Beş miRNA' nın Lenf Nodu Metastaz Varlığı ve Yokluğundaki Ekspresyon Seviyeleri. (*; p < 0.05)

Evreler arasında ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlenen 5 miRNA' nın tümünde literatürle uyumlu şekilde ekspresyon farklılıkları gözlemlendi. miR-106a' nın ekspresyon seviyesi lenf nodu metastazı varlığında anlamlı farklılık gösterdi ($p=0.03$) (Şekil-17).

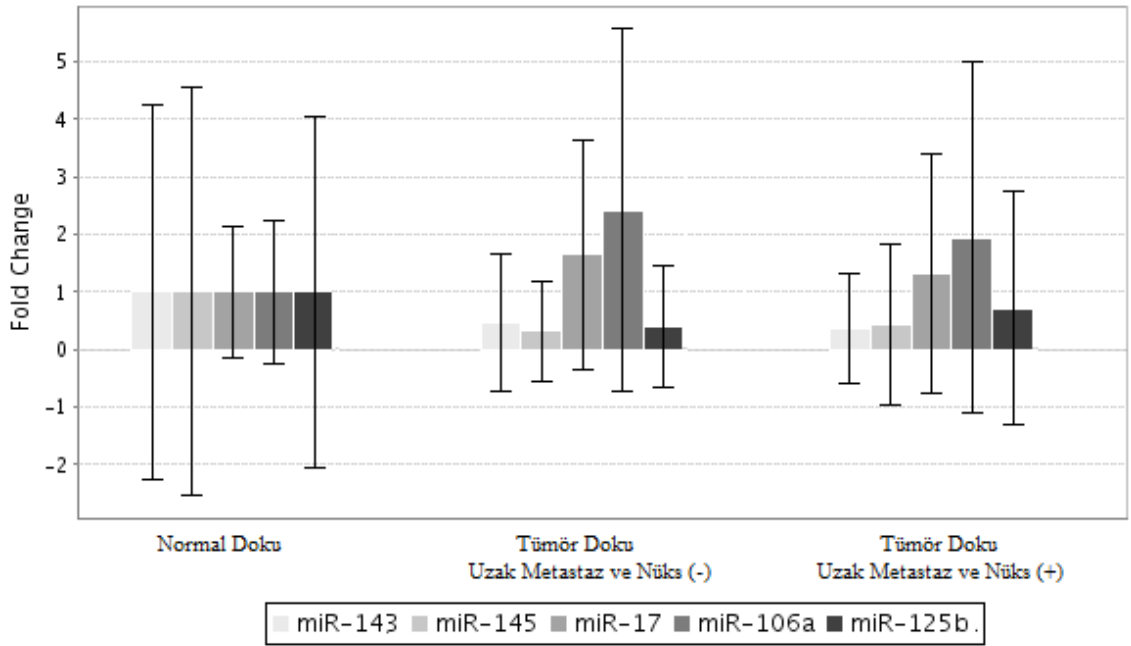


Şekil-17 Lenf Nodu Metastazı Durumu Açısından İstatistiki Olarak Anlamlılık Gösteren miR-106a' nın Ekspresyon Seviyesi

Nüks ve uzak metastaz görülmeyen hastalara ait tümör dokular ile nüks ve uzak metastaz görülen hastalara ait tümör dokular ve normal dokulara ait miRNA ekspresyon seviyeleri birbirleri ile karşılaştırıldıklarında farklı evrelere ait tümör dokularda farklı ekspresyon gösteren 5 miRNA' nın aynı şekilde değişim gösterdiği belirlendi (Tablo-15 ve Şekil-18).

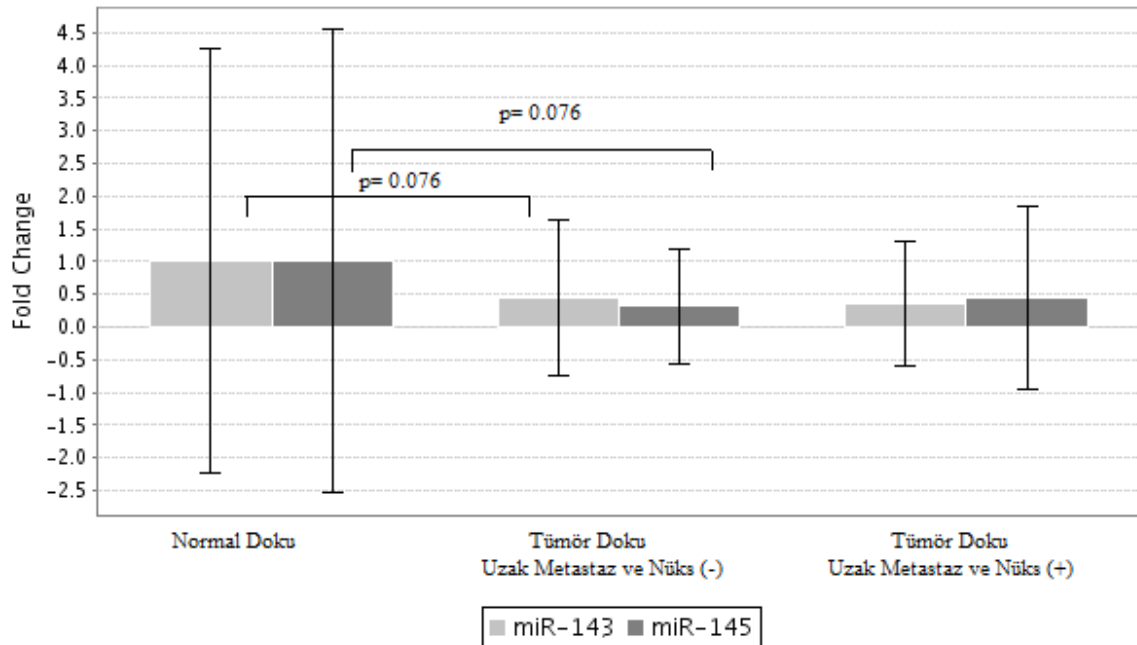
Tablo-15 Uzak Metastaz ve Nüks Durumunun Normal Doku ile Karşılaştırılması ile Elde Edilen Değerler

miRNA	Normal Doku	Tümör dokuda uzak metastaz ve nüks (-)			Tümör dokuda uzak metastaz ve nüks (+)		
	2 ⁻ (Avg.(Delta(Ct)))	2 ⁻ (Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p-değeri	2 ⁻ (Avg.(Delta(Ct)))	Kat Değişimi	p-değeri
miR-17	0.609	1.007	1.651	0.317	0.442	0.725	0.826
miR-145	5.296	1.742	0.286	0.076	2.445	0.477	0.086
miR-143	2.297	1.044	0.454	0.076	0.593	0.258	0.086
miR-125	9.334	4.022	0.430	0.299	5.635	0.603	0.718
miR-106a	0.353	0.846	2.394	0.359	0.400	1.133	0.490



Şekil-18 Belirlenen Beş miRNA' nın Uzak Metastaz ve Nüks Varlığı ve Yokluğundaki Ekspresyon Seviyeleri

Nüks ve uzak metastaz gözlenen hastalara ait tümör dokularında, metastaz görülmeyen hastaların tümör dokularına göre, miR-143 ekspresyon seviyesi 2 kat, miR-145' in ekspresyon seviyesinin ise 3 kat düştüğü gözlemlendi. Her iki miRNA' nında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın p değerlerine sahip olduğu gözlemlendi ($p=0.07$) (Şekil-19).

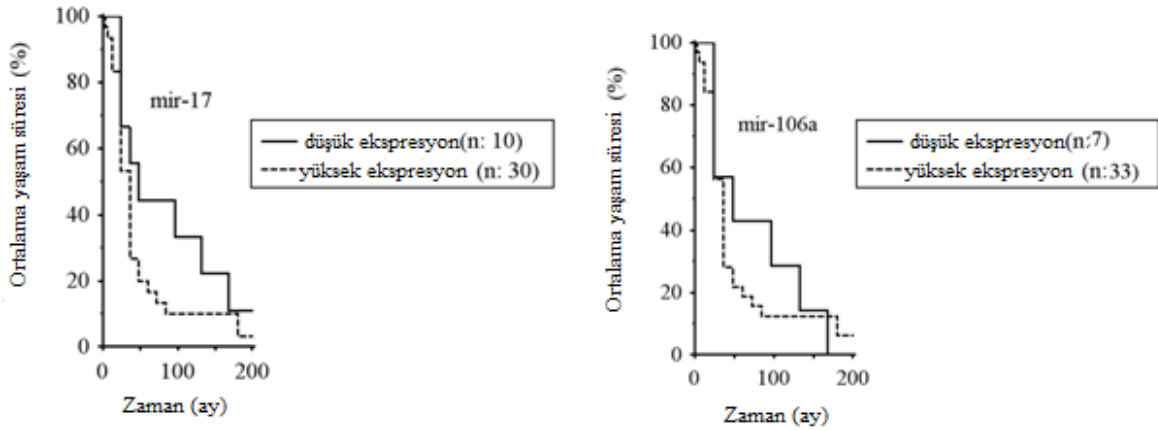


Şekil-19 Uzak Metastaz ve Nüks Durumu ile İstatistik Olarak Anlamlılığa Yakın Bir Değer Gösteren miR-143 ve miR-145' in Ekspresyon Seviyeleri

Değerlendirilen 38 miRNA arasından anlamlılığı belirlenen 5 miRNA' nın ekspresyon seviyelerinin, vakaların ortalama ve hastalısız yaşam süreleri ile karşılaştırılması, Medcalc programında yer alan Kaplan Meier Analizi ile gerçekleştirildi. Hastaların ortalama yaşam süreleri ele alınıp, normal doku ile karşılaştırıldığında yine 2 miRNA' nın ekspresyon seviyelerinde 1.5-2 kat arası artış gözlemlendi fakat p değerinde anlamlılık elde edilemedi (Tablo-17 ve Şekil-20).

Tablo-17 Ortalama Yaşam Süresi 5 Yıl ve 5 Yıldan Az Olan Hastalarda Farklılık Belirlenen 5 miRNA' nın Ekspresyon Değerleri

miRNA	Normal Doku	Ortalama yaşam süresi 5 yıl üstü			Ortalama yaşam süresi 5 yıl ve 5 yıldan az		
	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Fold Change	Kat değişimi	p değeri	2 [^] (-Avg.(Delta(Ct)))	Kat değişimi	p değeri
miR-17	0.609	0.538	0.882	0.646	0.927	1.521	0.384
miR-145	5.246	1.306	0.248	0.131	2.595	0.494	0.724
miR-143	2.618	0.595	0.227	0.059	1.191	0.455	0.106
miR-125b	9.334	3.447	0.369	0.1336	6.112	0.133	0.827
miR-106a	0.353	0.452	1.281	0.259	0.827	2.342	0.368

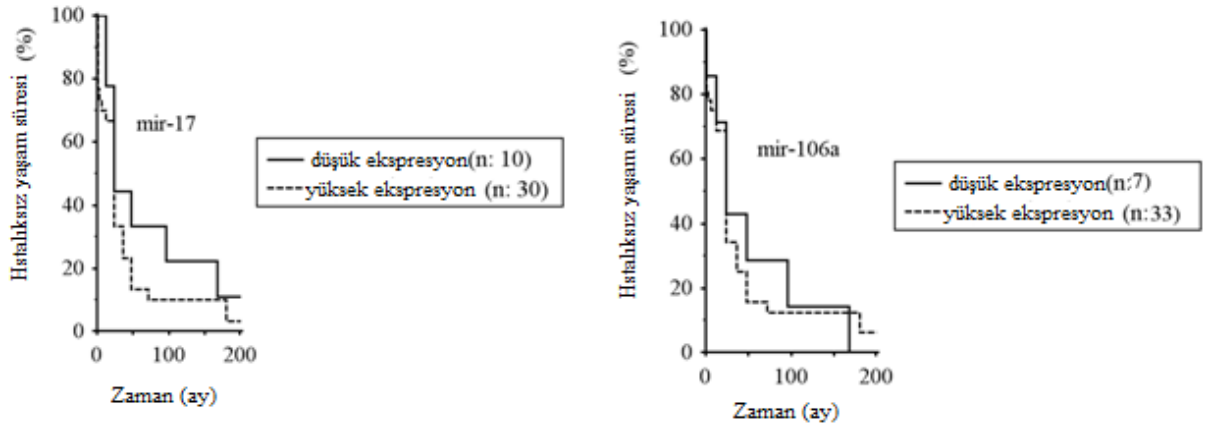


Şekil-20 Ortalama Yaşam Süresi 5 Yıldan Az olan Bireylerin Tümör Dokularında Ekspresyon Seviyelerinde Farklılık Gözlenen miRNA' lar

mir-17 ve mir-106a' nın yüksek ekspresyon seviyeleri, normal doku ile karşılaştırıldığında, 5 yıldan az hastaliksız yaşam süresine sahip hastalara ait tümör dokularında yaklaşık 1.5-2 kat artış gösterdiği belirlenmesine rağmen istatistiki olarak bir anlamlılığa ulaşamadığı belirlendi (Tablo-16 ve Şekil-21).

Tablo-16 Hastaliksız Yaşam Süresi 5 Yıl ve 5 Yıldan Az Olan Bireylere Ait Tümörlerde Farklılık Belirlenen 5 miRNA' nın Ekspresyon Değerleri

miRNA	Normal Doku	Hastaliksız yaşam süresi 5 yıl üstü			Hastaliksız yaşam süresi 5 yıl ve 5 yıldan az		
	2 ^{^(-Avg.(Delta(Ct))}	2 ^{^(-Avg.(Delta(Ct))}	Kat Değişimi	p değeri	2 ^{^(-Avg.(Delta(Ct))}	Kat Değişimi	p değeri
miR-17	0.609	0.478	0.784	0.921	0.800	1.313	0.410
miR-145	5.246	1.303	0.244	0.303	2.065	0.431	0.714
miR-143	2.618	0.510	0.220	0.157	0.989	0.413	0.371
miR-125b	9.334	3.256	0.348	0.193	5.135	0.550	0.618
miR-106a	0.353	0.405	1.146	0.476	0.699	1.979	0.4179



Şekil-21 Hastaliksız Yaşam Süresi 5 Yıldan Az olan Bireylerin Tümör Dokularında Ekspresyon Seviyelerinde Farklılık Gözlenen miRNA' lar

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kolorektal kanser karmaşık bir sürece sahip olan ve tüm dünyada en yaygın görülen kanserlerden biridir. Sporadik ya da ailesel kökenli olarak gelişen bu tümörler kansere bağlı ölümlerinde başlıca sebepleri arasındadır (14). Günümüzde moleküler biyoloji ve genetiğin gelişmesiyle birlikte kolorektal kanser oluşum sürecinde etkili olan genler ve bu genlerin yer aldıkları sinyal yolları tanımlanmıştır. *KRAS*, *BRAF*, *MLH1*, *MSH2* ve *APC* genlerinin kolorektal kanser gelişim sürecindeki etkileri belirlenmiş ve rutin hasta hizmeti dahilinde tanı ve tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır (17). Fakat tanımlanan bu genler ve etkili oldukları sinyal yolları kanser gelişiminin tamamen anlaşılmasında yetersiz kalmaktadır.

Kolorektal kanserin en önemli özelliği hastaların çoğunda uzak metastaz varlığıdır. Kolorektal kanserin ilk gelişim evrelerine ait spesifik belirtiler bulunmamakta olup yavaş ilerleyen kanser tipine örnektir. Bu nedenle hastaların yaklaşık %60' ında tanı sırasında uzak metastaz gözlenmektedir. Kolorektal kanserli hastalarda tanı sonrası yaşam süresi tanı sırasındaki klinik ve patolojik evrelere bağlıdır. Erken evre kanser hastalarının tanı sonrası 5 yıllık yaşam süresi %90 oranında iken, lenf nodu oluşmuş hastalarda bu oran %35-60' a, uzak metastaz gelişen hastalarda ise %10' a kadar düşmektedir. Evre 3 tümörlerinde lenf nodu metastazı, evre 4 tümörlerinde ise uzak organ metastazı görülmekte ancak erken tümör evresi olan evre 1-2' de patolojik bir belirteç bulunmamaktadır. Bu nedenle kanserin erken evrelerinde, tümörün metastatik potansiyeli için yardımcı olabilecek yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (21).

Son dönemde yapılan araştırmalarla kanser oluşumunda sadece genetik değişimlerin değil epigenetik değişimlerinde rol aldığı gösterilmiştir. Kolorektal kanserin epigenetik temellerini araştıran çalışmalarda, protein kodlamayan miRNA olarak adlandırılan küçük RNA molekülleri keşfedilmiştir. miRNA' ların hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, strese karşı cevap, apoptosis ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi birçok hücre fonksiyonunda rol aldıkları, hücre içi ve hücre dışı sinyal yollarında etkili oldukları saptanmıştır. Genetik ve epigenetik değişimler sonucu meydana gelen kolorektal tümörlerin oluşum sürecinde etkili olabilecek miRNA' lar tanımlanmaya başlanmıştır. Günümüz çalışmaları, kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanılacak yeni moleküllerin belirlenebilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarla kanser oluşumunda etkili olan değişimlerin popülasyonlar ve hatta bireyle arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır (3). Üstelik farklı yaş gruplarına ait, sporadik ve

ailesel olarak gelişen kolorektal kanserli hasta gruplarında yapılan çalışmalar, kanser oluşumuna neden olan genetik ve epigenetik değişimlerin tümör alt tiplerine göre farklılıklar gösterdiğini belirtmektedir.

Ülkemizde de en yaygın görülen kanserlerden biri olan kolorektal kanserin batı toplumlarına oranla genç yaşta görülme sıklığı daha fazladır. Genç yaşta oluşan kolorektal tümörler ileri yaşlarda gelişen tümörlerden daha kötü prognoza sahiptirler ve yüksek oranda uzak metastaz gelişim riski taşımaktadırlar. Gelişmiş toplumlarda, kolorektal kanserin tanı ve tedavisinde kullanılabilen belirteçlerin sayısı oldukça azdır. Fakat Türk toplumuna özgü biyobelirteçler ise henüz yeni araştırılmaya başlanmıştır. Kolorektal kanser gelişim sürecinde etkili oldukları belirlenen miRNA' ların Türk popülasyonuna ait ekspresyon seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışma ise bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, PCR array teknolojisinden yararlanarak, genç yaşta kolorektal kanser tanısı almış hastaların tümör dokularında miRNA ekspresyon seviyelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı histolojik evrelere ait tümör dokularında miRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek sporadik gelişen erken evreli tümörlerde, tümörün metastatik potansiyeli hakkında belirteç olabilecek miRNA' lar belirlenmeye çalışıldı.

Sporadik olarak gelişen, 50 yaş altı kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait tümör dokuları kontrol grubu olarak alınan normal dokular ile karşılaştırıldığında, değerlendirilen 38 miRNA arasından, onkogenik özellik gösteren miR-200a, miR-20a, miR-15a, miR-183, miR21, miR-17, miR-155, miR-106a, miR-96, miR-223, miR-148a' nın ve tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-143, miR-145, miR-124, miR-133b ve miR-125b' in ekspresyon seviyelerinde farklılıklar tanımlandı. Bu 17 miRNA arasından miR-145' in tümör dokudaki ekspresyonunda, normal dokulara göre, 2 kat düşüş olduğu gözlemlendi. miR-143 ekspresyonunda ise tümör dokularında, normal dokulara göre ekspresyon seviyesinin 2.5 kat azalma gösterdiği belirlendi ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($p= 0.01$).

Çalışmada, farklı evrelere ait tümörlerin birbirleri ve kontrol grup ile karşılaştırılması sonucunda 38 miRNA' dan 5'inde (miR-17, miR-106a, miR-125b, miR-143 ve miR-145) ekspresyon seviyelerinde farklılıklar belirlendi. Onkogenik özellik gösteren miR-17' nin normal dokuya göre tümör dokudaki ekspresyonunda yaklaşık olarak 2 kat artış gözlemlendi. İleri evre tümörlerde miR-125b, miR-143 ve miR-145' in ekspresyonlarının, normal ve düşük evreli tümör dokulara göre 1-1.5 kat azaldığı belirlendi. Bu miRNA' lar arasından miR-106a' nın ekspresyonunun, normal dokuya göre

evre 1-2 tümörlerinde 1.5, evre 3 tümörlerinde 2.1, evre 4 tümörlerinde ise 4.4 kat artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p= 0.02$).

miR-17-92 ailesinde yer alan miR-17, 13q31.3 kromozom bölgesinde lokalizedir. Bu aile içerisinde yer alan miRNA' lar *E2F* gen ailesindeki genleri hedef alarak hücre döngüsüne etki etmektedirler (108-110). İlk olarak lösemide tanımlanan miR-17, kolorektal kanser tümörleri başta olmak üzere birçok tümörde yüksek seviyede eksprese olarak *E2F1* ve *cMYC* genlerini baskılamakta, hücre döngüsüne ve hücre ölümüne etki etmektedir. Diosdado ve arkadaşları (109) 2009 yılında yaptıkları çalışma ile miR-17' nin kolon epitelyumunun embriyonik gelişiminde ve neoplazik dönüşümünde görev aldığını ifade etmişlerdir. 2012 yılında Shengkui ve arkadaşları (111) glioma hücrelerinde miR-17' nin ekspresyon seviyesini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda miR-17' nin beyin tümörlerinde yüksek seviyede ekspresyon gösterdiğini ve bu yüksek ekspresyonu agresif klinopatolojik özelliklerle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada, yüksek seviyede eksprese olan miR-17' nin kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Mevcut tez çalışmasında, miR-17 ekspresyonu, normal doku ile karşılaştırıldığında tümör dokuda 1.4 kat artış gösterdi. miR-17 ekspresyon düzeyinde, uzak metastaz varlığı ile karakterize edilen evre 4 lerde 3 kat yükselme belirlendi ($p= 0.07$). Bu bulgulara paralellik gösteren 2012 yılında Ge Yu ve arkadaşlarının (108) çalışmalarında da, miR-17' nin ekspresyonu, normal doku ile karşılaştırıldığında, kolorektal tümörlerde yüksek seviyelerde görülmüş ve bu ekspresyon seviyesinin kolorektal tümörler için prognostik bir belirteç olabileceği belirlenmiştir. Mevcut çalışmada, miR-17 ekspresyon seviyesi, lenf nodu metastazı varlığında ise 2 kat artış gösterdi. Ge Yu ve arkadaşlarının (108) yukarıda bahsi geçen çalışmalarında, miR-17' nin yüksek ekspresyonu kolorektal kanser hastalarında kısa yaşam süresi ile ilişkilendirilmiş ve kötü prognoz biyobelirteci olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Mevcut çalışmada da, gerçekleştirilen Kaplan Meier analizleri ile miR-17 ekspresyon seviyesinin, hastaların ortalama ve tanı sonrası hastaliksız yaşam süreleri ile ilişkisi değerlendirildiğinde miR-17 ekspresyonunun 5 yıldan kısa hastaliksız yaşam süresine sahip hastalarda 1.5 kat ($p= 0,9$), 5 yıldan kısa ortalama yaşam süresine sahip hastalarda ise 1.3 kat artış gösterdiği belirlendi ($p= 0,6$). Daha yüksek vaka sayısı ile çalışıldığında istatistiki anlamlılığa ulaşabileceği düşünülmektedir. Kısa yaşam süresine sahip hastaların tümör dokularındaki miR-17' nin yüksek ekspresyonu ile ilgili bulgular, Türk popülasyonuna ait kolorektal kanser hastaları için de bu miRNA' nın kötü prognoz belirteci olabileceğini düşündürmektedir. miR-17 ekspresyonunun normal dokuya göre evre 4 tümörlerinde 3 kat artması ve anlamlılığa

yakın bir p değeri vermesi, sporadik olarak gelişen bu tümörlerde metastatik bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalar, 11q23-24' de lokalize olan miR-125b' nin, çeşitli hücre tiplerinde, proliferasyon, farklılaşma ve hücre ölümü gibi biyolojik süreçlerde görev aldığı ve birçok kanserin gelişiminde etkili bir miRNA olduğunu göstermiştir. Ayrıca, miR-125b ekspresyonunun farklı kanserlerde, onkogenik ya da tümör baskılayıcı olarak değiştiğini göstermektedir. Ayrıca miR-125b' nin ekspresyon seviyesinde tümör alt tiplerine ve hatta hücre tiplerine göre de farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. Örneğin tiroid kanserlerde, tiroid foliküler adenomlarda ve papiller tiroid tümörlerde yüksek ekspresyon gösterirken anaplastik tiroid tümörlerde düşük seviyede eksprese olmaktadır (112, 113). miR-125b ekspresyonu başta hepatoselüler ve kolorektal kanser olmak üzere birçok kanserde hücre proliferasyonunu ve tümör oluşumunu inhibe etmektedir. 2010 yılında Naohiro ve arkadaşlarının (112) Japon popülasyonuna ait 89 tümör dokuda yaptıkları çalışmada, miR-125b ekspresyonunun 44 hastada düşük, 45 hastada ise yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu iki hasta grubunun karşılaştırılması sonucunda, tümör dokularında miR-125b yüksek ekspresyonunun belirlendiği hastaların daha kötü prognoza sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca bu hastaların tümör büyüklüğü ve yayılımının, tümör dokularında miR-125b ekspresyonu düşük hastalara göre çok daha büyüktür. Yapılan çalışmada miR-125b ekspresyon seviyesinin, cinsiyet, yaş, lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı ve nüks ile ilişkisinin olmadığı açıklanmıştır. Mevcut tez çalışmasında, normal doku ile karşılaştırıldığında, tümör dokuda miR-125b ekspresyonunda düşüş gözlemlendi. Ayrıca lenf nodu metastazı gözlenmeyen hastalarla, lenf nodu metastazı gözlenen hastalar karşılaştırıldığında, lenf nodu metastazının gözlemlendiği hastalara ait tümör dokularında miR-125b seviyesinde yaklaşık 1.5 kat azaldığı belirlendi (p= 0,8). Elde edilen bulgular, çeşitli tümörlerde, tümör baskılayıcı ya da onkogenik olarak görev aldığı bilinen miR-125b' nin, sporadik olarak genç yaşta gelişen kolorektal tümörlerde de ekspresyon seviyesindeki azalmanın tümör oluşumunda görev alabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte daha yüksek vaka sayısı ile çalışıldığında istatistiki anlamlılığa ulaşılacağı düşünülmektedir.

miR-143 ve miR-145 kolorektal tümörlerde tanımlanan ilk miRNA' larıdır. 5q32' de lokalize olan bu miRNA' lar kolorektal kanserde tümör baskılayıcı özellik göstermektedirler. Micheal ve arkadaşları (84) 2003 yılında normal kolon dokusu ile farklı evrelere ait kolorektal tümörlerdeki miRNA ekspresyon seviyelerini karşılaştırdıklarında, miR-143 ve miR-145' in tümör dokularında düşük seviyede eksprese olduklarını belirlemişlerdir. Günümüze kadar farklı popülasyonlar ile yapılan çalışmalarla da bu iki

miRNA' nın kolorektal tümörlerdeki düşük ekspresyon seviyeleri doğrulanmıştır (116-118). Birçok kanserde tümör baskılayıcı özellik gösteren miR-145, kolorektal tümörlerde, AKT ve ERK sinyal yollarında yer alan *IRS-1*, *cMYC*, *YES1*, *STAT1*, *OCT4* genlerini hedef alarak hücre büyümesini ve proliferasyonu baskılamaktadır. miR-145 ile aynı bölgede lokalize olan miR-143' de kolorektal kanser gelişim sürecindeki en etkili miRNA' lardan biridir. miR-143 hücre içi ve dışında etkili birçok sinyal yolağını etkilemektedir. Kolorektal kanserde tümör baskılayıcı özellikte olan bu miRNA, *KRAS*, *DNMT3A* ve *ERK* genlerini hedef alarak hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Ancak bu miR-143' ün ekspresyon seviyesindeki düşme ile hedef aldığı genlerin ifadelerinde yükselme meydana gelmekte ve hücre proliferasyonunda artış görülmektedir. Bu durum kolorektal tümör gelişiminin başlamasına neden olmaktadır (116, 117). Mevcut çalışmada, Türk popülasyonuna ait hastalarda gelişen kolorektal tümörlerde normal mukozaya göre miR-143 ve miR-145' in ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda mevcut çalışmada, çalışmada, nüks ve uzak metastaz durumu ele alınıp kontrol grup ile karşılaştırıldığında miR-145 ve miR-143' ün ekspresyon seviyelerinde 1.5-2 kat arası düşüş gözlemlendi (miR-143' ün p değeri 0,4, miR-145' in p değeri 0,2 olarak belirlendi). Mevcut çalışmada istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamamış olsa da değerlendirilen vaka sayısının artırılması durumunda anlamlı istatistiksel değere ulaşılacağı düşünülmektedir. Nüks ve uzak metastaz varlığı yüksek evreli tümörler için histopatolojik belirteçlerdir. Fakat düşük evreli tümörlerde bu belirteçlerin varlıkları tespit edilememektedir. Elde edilen bulgular sonucunda düşük evreli tümörlerde miR-143 ve miR145' in ekspresyon seviyelerinin nüks ve uzak metastaz oluşum riski hakkında bilgi verebilecek birer biyobelirteç olabilecekleri düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada bu iki miRNA' nın Türk popülasyonuna ait genç yaşta sporadik olarak gelişen, erken evreli kolorektal tümörlerin hastalığın seyri konusunda bilgi edinmek amacıyla ile kullanılabilecekleri gösterilmektedir. Literatürde sporadik olarak gelişen genç yaşta tanı almış hasta tümörlerinde miR-143 ve miR-145 ekspresyon seviyelerinin klinik özellikler ile beraber değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Xq26.2' de lokalize olan miR-106a, miR-106a-92 miRNA ailesi içerisinde yer almakta ve onkogenik özellik göstermektedir. miR-106a ilk olarak 2005 yılında Croce ve arkadaşlarının (118) yaptıkları çalışma ile kanserle ilişkilendirilmiştir. Çalışmada meme, kolon, akciğer, prostat, pankreas ve cilt kanserlerine ait 540 tümör dokuda 228 farklı insan miRNA' sının ekspresyon profilleri incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda, miR-106a' nın kolon kanserlerinde yüksek seviyede eksprese olduğu ve *RBI* genini (119) hedef alarak

kolon kanseri oluşumunda etkili olduğu belirlenmiştir. 2008 yılında Shetter (120) ve arkadaşları sporadik ya da ailesel olarak gelişen kolorektal tümörlerin farklı evrelerinde miR-106a' nın ekspresyon seviyesini incelemişler ve evre 1-2 tümörlerinde yüksek ekspresyon, evre 3-4 tümörlerinde ise düşük seviyelerde ekspresyon gözlemlemişlerdir. Mevcut çalışmada ise miR-106a ekspresyon seviyesinin, tümör dokuda, normal dokuya göre daha yüksek olduğu, uzak organ metastazı ile karakterize edilen ve geç evre olarak tanımlanan evre 4 tümörlerinde ise yaklaşık 4.5 kat artış gösterdiği belirlendi. Çalışmada tüm evreler göz önüne alındığında, miR-106a' nın ekspresyon seviyesindeki artışın TNM evreleme sistemi ile korelasyon gösterdiği saptandı. Çalışma ile paralel olarak, Xiao ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları araştırma ile, miR-106a ekspresyon seviyesinin gastrit kanserlerde TNM evreleme sistemi ile korelasyon gösterdiğini ve yine aynı kanserde lenf nodu ve uzak organ metastazı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Monzo ve arkadaşları da (121) miR-106a' nın yüksek ekspresyonunun kolon tümöründe kötü prognozla ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Mevcut çalışmada da miR-106a ekspresyon seviyesi, lenf nodu metastaz durumunun normal doku ile karşılaştırılması sonucunda 1.6 kat artış belirlendi ve istatistiki anlamlılık gösterdi. Daha önce Türk populasyonunda miR-106a' nın ekspresyonunun incelendiği herhangi bir kanser araştırması bulunmamaktadır. Mevcut çalışmanın bulguları, miR-106a yüksek ekspresyon seviyesinin, Türk populasyonunda, sporadik olarak gelişen, genç yaş hastalara ait tümörlerde, metastatik potansiyel hakkında bilgi verebilecek moleküler bir belirteç olabileceğini desteklemektedir.

Mevcut çalışmanın sınırlamaları; Vaka sayısının azlığı (Türk populasyonunda erken yaşta tanı almış, aile hikayesi olmayan, her evreye ait 10 kolorektal tümör olacak şekilde, 40 hastaya ait tümör doku ve kontrol grubu oluşturan 8 kolon mukozası ele alındı.) sebebiyle farklılık belirlenen tüm parametrelerde istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı. Bugüne kadar tanımlanmış tüm miRNA' ları kapsayan mikroarray sistemi ile çalışılmadığından (Kolorektal kanser oluşum sürecinde rol oynadığı bilinen 38 farklı miRNA değerlendirilmiştir.)Türk populasyonuna ait kolorektal kanser hastalarına özgü farklı biyobelirteçler tanımlanamadı.

Sonuç olarak, mevcut çalışma Türk populasyonuna ait, aile hikayesi bulunmayan ve genç yaşta kolorektal kanser tanısı almış hastalara ait tümör dokularında; miRNA ekspresyon değişimlerinin tanı, tedavi ve hasta takibinde etkili biyobelirteç olarak yararlanılabileceği fikriyle kurgulanmış literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışmada, Türk populasyonuna ait genç yaşta gelişen tümörde, miR-106a' nın yüksek, miR-143' ün düşük

seviyelerdeki ekspresyonlarının bu hasta grubu için belirleyici olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular ışığında; sporadik olarak gelişen bu tümörlerde miR-143 ve miR-106a ekspresyon düzeylerindeki farklılıklar değerlendirilerek, tümörün agresivitesi ve hastada metastaz gelişebilme riski ile ilgili bilgi edinilebileceği düşünülmektedir. Böylece diğer kolorektal kanser hastaları ile benzer tedavi yaklaşımları uygulanarak takip edilen bu hasta grubunda, etkin tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesinde katkı oluşturarak hastaların yaşam süresinin ve kalitesinin iyileştirilebilmesine imkan sağlanabilecektir. Bu özellikteki tümörlerin tedavisinde, miR-106a ekspresyonunu düşürecek ya da miR-143 ekspresyonunu arttıracak yeni moleküllerin ve yöntemlerin bulunmasında, çalışmanın kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen bulgular; genç yaşta tanı almış, aile hikayesi olmayan hastalarda kötü prognozun takibini sağlayabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda uluslararası ve ulusal literatüre katkı sağlar niteliktedir.

Çalışmada elde edilen bulgular ile yapılacak bundan sonraki ileri fonksiyonel çalışmalar için yol gösterici olması düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. AIELLO M, VELLA N, CANNAVO C, SCALISI A, SPANDIDOS DA, TOFFOLI G, BUONADONNA A, LIBRA M, STIVALA F. Role of genetic polymorphisms and mutations in colorectal cancer therapy (Review). *Molecular Medicine Reports*, 4: 203-208, 2011.
2. BEDEIR A, KRASINSKAS AM. Molecular Diagnostics of Colorectal Cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 135: 204-215, 2011.
3. BARTELS CL, TSONGALIS GJ. MicroRNAs: Novel biomarkers for human cancer. *Clinical Chemistry*, 55: 4623-4631, 2009.
4. PILLAI RS, BHATTACHARYYA SN, FILIPOWICZ W. Repression of protein synthesis by miRNAs: How many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17: 118-126, 2007.
5. IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, VERONESE A, SPIZZO R, SABBIONI S, MAGRI E, PEDRIALI M, FABBRI M, CAMPIGLIO M, MÉNARD S, PALAZZO JP, ROSENBERG A, MUSIANI P, VOLINIA S, NENCI I, CALIN GA, QUERZOLI P, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, 65: 7065-7070, 2005.
6. LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BL, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435: 834-838, 2005.
7. VOLINIA S, CALIN GA, LIU CG, AMBS S, CIMMINO A, PETROCCA F, VISIONE R, IORIO M, ROLDO C, FERRACIN M, PRUEITT RL, YANAIHARA N, LANZA G, SCARPA A, VECCHIONE A, NEGRINI M, HARRIS CC, CROCE CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 2257-2261, 2006.
8. ZHANG L, HUANG J, YANG N, GRESHOCK J, MEGRAW MS, GIANNAKAKIS A, LIANG S, NAYLOR TL, BARCHETTI A, WARD MR, YAO G, MEDINA A, O'BRIEN-JENKINS A, KATSAROS D, HATZIGEORGIOU A, GIMOTTY PA, WEBER BL, COUKOS G. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 9136-9141, 2006.
9. CALIN GA, CROCE CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6: 857-866, 2006.
10. CHRISTINE A, LACOBUZIO D, ELIZABETH M. Epithelial neoplasms of the colorectum. In: *Gastrointestinal and Liver Pathology*. Churchill Livingstone Elsevier, 367-394, 2005.
11. MARTENSON JA, WILLETT CG, SARGENT DJ, MAILLIARD JS, DONOHUE JH, GUNDERSON LL. Phase III study of adjuvant chemotherapy and radiation therapy compared with chemotherapy alone in the surgical adjuvant treatment of colon cancer: results of intergroup protocol 0130. *J Clin Oncol*, 16: 3277-3283, 2004.
12. FENOGLIO-PREISER CM, NOFFSINGER AE, STEMMERMANN GN, LANTZ PE, LISTROM MB, RILKE FO. Carcinomas and other epithelial and neuroendocrine tumors of the large intestine. In: *Gastrointestinal pathology an atlas and text*, 909-1068, 1999.

13. ANNE BB, CLIVE A. Colorectal cancer. Clinical review. *BMJ*, 335: 715-718, 2007.
14. MIGLIORE , MIGHELI F, SPISNI R, COPPEDE F. Genetics, Cytogenetics and Epigenetics of Colorectal Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2011/792362
15. ASR, Turkey, 2008.
16. HALF E, BERCOVICH D, ROZEN P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4: 100-115, 2009.
17. LABIANCA R, BERETTA DG, KILDANI B. Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2: 106-133, 2010
18. YILMAZLAR T, ZORLUOGLU A, OZGUC H, KORUN N, DUMAN H, KAYA E, KIZIL A. Colorectal cancer in young adults. *Tumori*, 81:230-233, 1995.
19. CUNNINGHAM D, ATKIN W, LENZ HJ. Colorectal cancer. *The Lancet*, 375: 1030-1047, 2010.
20. PRITCHARD C, GRADY WM. Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 60: 116-129, 2011.
21. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57-70, 2000.
22. LITTLE MP, VINEIS P, LI G. A stochastic carcinogenesis model incorporating multiple types of genomic instability fitted to colon cancer data. *J Theor Biol*, 254: 229-238, 2008.
23. HERMSEN M, POSTMA C, BAAK J. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 123: 1109-1119, 2002.
24. GRADY WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 21: 11-27, 2004.
25. WALTHER A, JOHNSTONE E, SWANTON C. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 9: 489-499, 2009.
26. WALTHER A, HOULSTON R, TOMLINSON I. Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*, 57: 941-950, 2008.
27. NOFFSINGER AE. Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy. *Annu Rev Pathol* 4: 343-3464, 2009.
28. <http://www.genome.jp/kegg/>
29. GOLDSTEIN NS. Serrated pathway and APC (conventional)-type colorectal polyps: molecularemorphologic correlations, genetic pathways, and implications for classification. *Am J Clin Pathol*, 125: 1461453, 2006.
30. GRADY WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 23: 11-27, 2004.
31. TAKAYAMA T, OHI M, HAYASKI T, MIYANISHI K, NOBUOKA A, NAKAJIMA T. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 121: 599-611, 2001.
32. SMITH G, CAREY FA, BEATTIE J, WILKIE MJ, LIGHTFOOT TJ, COXHEAD J. Mutations in APC, Kirsten-ras and p53 -alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 99: 9433-8, 2009.
33. SJOBLOM T, JONES S, WOOD LD, PARSONS DW, LIN J, BARBER TD. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, 314: 268-274, 2006.
34. CADIGAN KM, LIU YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 119: 395-402, 2006.

35. KUHNERT F, DAVIS CR, WANG HT, CHU P, LEE M, YUAN J. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 266-271, 2004.
36. FODDE R, KUIPERS J, ROSENBERG C, SMITSR, KIELMAN M, GASPAR C. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*, 3: 433-438, 2001.
37. JASS JR, WHITEHALL VL, YOUNGH J, LEGGETT BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 123: 862-76, 2002.
38. LESLIE A, CAREY FA, PRATT NR, STEELE RJ. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, 89: 845-860, 2002.
39. GEIGL JB, OBENAUF AC, SCHWARZBRAUN T, SPEICHER MR. Defining 'chromosomal instability'. *Trends Genet*, 24: 64-69, 2008.
40. DYRO T, LI J, WANG K, LINDABJERG J, KOLVRAA S, BOLUND L, JACOBSEN A, BRUUN-PETERSEN G, LI S, CRUGER DG. Identification of chromosome aberrations in sporadic microsatellite stable and unstable colorectal cancers using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet*, 204: 84-95, 2011.
41. BARDI G, PARADA LA, BOMME L, PANDIS N, JOHANSSON B, WILLEN R, FENGER C, KRONBORG O, MITELMAN F, HEIM S. Cytogenetic findings in metastases from colorectal cancer. *Int J Cancer*, 72: 604-607, 1997.
42. THIAGALINGAM S, LENGAUER C, LEACH FS. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet*, 13:343-6, 1996.
43. OGINO S, NOSHO K, IRAHARA N. Prognostic significance and molecular associations of 18q loss of heterozygosity: a cohort study of microsatellite stable colorectal cancers. *J Clin Oncol*, 27: 4591-4598, 2009.
44. FEARON ER, CHO KR, NIGRO JM. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247: 49-56, 1990.
45. POPAT S, HOULSTON RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 41: 2060-70, 2005.
46. RUSSO A, RIZZO S, BRONTE G, SILVESTRIS N, COLUCCI G, GEBBIA N, BAZAN V, FULFARO F. The long and winding road to useful predictive factors for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal carcinoma: the KRAS/BRAF pathway. *Oncology*, 77: 57-68, 2009.
47. BENVENUTI S, SARTORE-BIANCHI A, DI NICOLANTONIO F, ZANON C, MORONI M, VERONESE S, SIENA S, BARDELLI A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res*, 67: 2643-2648, 2007.
48. DI NICOLANTONIO F, MARTINI M, MOLINARI F, SARTORE-BIANCHI A, ARENA S, SALETTIP, DE SOSSO S, MAZZUCHELLI L, FRATTINI M, SIENA S, BARDELLI A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26: 5705-5712, 2008.
49. SOUGLAKOS J, PHILIPS J, WANG R, MARWAH S, SILVER M, TZARDI M, SILVER J, OGINO S, HOOSHMAND S, KWAK E, FREED E, MEYERHARDT JA, SARIDAKI Z, GEORDOULIAS V, FINKELSTEIN D, FUCHS CS, KULKE MH, SHIVDASANI RA. Prognostic and predictive value of common mutations for

- treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J Cancer*, 101: 465-472, 2009.
50. OGINO S, NOSHO K, KIRKNER GJ, KAWASAKI T, MEYERHARDT JA, LODA M, GIOVANNUCCI EL, FUCHS CS. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*, 58: 90-96, 2009.
 51. ROTH AD, TEJPAN S, DELORENZI M, YAN P, FIOCCA R, KLINGBIEL D, DIETRICH D, BIESMANS B, BODOKY G, BARONE C, ARANDA E, NORDLINGER B, CISAR L, LABINCA R, CUNNINGHAM D, VAN CUTSEM E, BOSMAN F. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Onco*, 28: 466-474, 2010.
 52. KANE MF, LODA M, GAIDA GM, LIPMAN J, MSHRA R, GOLDMAN H, JESSUP JM, KOLODNER R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, 57: 808-811, 1997.
 53. ESTELLER M, LEVINE R, BAYLIN SB, ELLENSON LH, HERMAN JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene*, 17: 2413-2417, 1998.
 54. KIM H, JEN J, VOLGESTEIN B, HAMILTON SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*, 145: 148-156, 1994.
 55. PANCIONE M, REMO A, COLANTUONI V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathol Res Int*, doi:10.1155/2012/509348
 56. EAST JE, SAUNDERS BP, JASS JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am*, 37: 25–46, 2008.
 57. SPITZNER M, EMONS G, KRAMER F, JOCHEN G, RAVE FRANK M, SCHARF JN, BURFEIN P, BECKER H, BEISSBARTH T, GHADIMI M, RIED T, GRADE M. A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int J Radiation Oncology Bio Phys*. 78:1184-1192, 2010.
 58. TUNCA B, TEZCAN G, CECENER G, EGELI U, ZORLUOGLU A, YILMAZLAR T, AK S, YERCI O, OZTURK E, UMUT G. EVRENSEL T. Overexpression of CK20, MAP3K8 and EIF5A correlates with poor prognosis in early-onset colorectal cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 139:691-702, 2013.
 59. TOYOTA M, OHE M, AHUJA N, ISSA JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci* 97:710–715, 2000.
 60. JONES GRIFFITHS S, KAUR SAINI H, DONGEN S, ENRIGHT AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkm952, 2007.
 61. WIJNHOFEN BP, MICHAEL MZ, WATSON DI. MicroRNAs and cancer. *The British Journal of Surgery*, 94: 23-30, 2007.
 62. SHENOUDA SK, ALAHARI SK. MicroRNA function in cancer: Oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Reviews*, 28: 369-378, 2009.
 63. LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75: 843-854, 1993.

64. GOEL A, BOLAND R. Epigenetics of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 143:1442-1460, 2012.
65. MANUELIDIS L. A view of interphase chromosomes. *Science*, 250:1533-1540, 1990.
66. BABA s. Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer. *World j Surg*, 21:678-687, 1997.
67. YUNIS J. Fragile sites, genomic rearrangements and cancer predisposition. *Birth defects: original article series* 26:67-83, 1999.
68. ZIMONJIC DB, DRUCK T, OHTA M, KASTURY K, CROCE CM, POPESCU NC, HUEBNER K. Positions of chromosome 3p14.2 fragile sites (FRA3B) within the FHIT gene. *Cancer Res*, 57:166–1170, 1997.
69. GELOVANI JG. Molecular imaging of epidermal growth factor receptor expression activity at the kinase level in tumors with positron emission tomography. *Cancer Metastasis Rev*, 27:645–53, 2008.
70. YENTZ S, WANG TD. Molecular Imaging for Guiding Oncologic Prognosis and Therapy in Esophageal Adenocarcinoma. *Hosp Pract*, 39:97-106, 2011.
71. TUNCA B, EGELI U, ZORLUOGLU A, YILMAZLAR T, YERCI O, KIZIL A. The expression of fragile sites in lymphocytes of patients with rectum cancer and their first-degree relatives. 152:201-209, 2000.
72. TUNCA B, EGELI U, ZORLUOGLU A, YILMAZLAR T, YERCI O, KIZIL A. The Expression Frequency of Common Fragile Sites and enetic Predisposition to Colon Cancer. 119:139-145, 2000.
73. REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR, RUVKUN G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901-906, 2000.
74. PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, HAYWARD DC, BALL EE, DEGNAN B, MÜLLER P, SPRING J, SRINIVASAN A, FISHMAN M, FINNERTY J, CORBO J, LEVINE M, LEAHY P, DAVIDSON E, RUVKUN G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408: 86-89, 2000.
75. LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294: 853-858, 2001.
76. CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRI CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 2999-3004, 2004.
77. KWAK PB, IWASAKI S, TOMARI Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Science*, 101: 2309-2315, 2010.
78. LEE Y, AHN C, HAN J, CHOI H, KIM J, YIM J, LEE J, PROVOST P, RÅDMARK O, KIM S, KIM VN. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-419, 2003.
79. ESQUELA-KERSCHER A, SLACK FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *National Reviews Cancer*, 6: 259-269, 2006.
80. SLABY O, SVOBODA M, MICHALEK J, VYZULA R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Molecular Cancer*, 8: 102-115, 2009.

81. BARANISKIN A, BIRKENKAMP K, MAGHNOUI A. MiR-30a- 5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis*, 33:732-739, 2012.
82. BRAUN CJ, ZHANG X, SAVELYEVA I. p53-responsive microRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res*, 68:10094-10104, 2008.
83. SCHETTER AJ, OKAYAMA H, HARRIS CC. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. *Cancer J*, 18: 244-252, 2012.
84. MICHEAL MZ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1: 882–891, 2003.
85. AKAO Y. et al. Let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 29: 903–906, 2006.
86. SCHEE K, FODSTAD O. MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer. *The American Journal of Pathology*, 177: 124-132, 2010.
87. BURK U, SCHUBERT J, WELLNER U, SCHMALHOFER O, VINCAN E, SPADEMA S, BRABLETZT. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep*, 9: 582-589, 2008.
88. BOMMER GT, GERIN I, FENG Y, KACZOROWSKI AJ, KUICK R, LOVE RE, ZHAI Y, GIORDANO TJ, QIN ZS, MOORE BB, MACDOUGALD OA, COA KR, FEARON ER. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumorsuppressor genes. *Curr Biol*, 17: 1298-1307, 2007.
89. SLABY O, SVOBODA M, FABÍAN P, SMERDOVA T, KNOFLICKOVA D, BEDNARIKOVA M, NENUTIL R, VYZULA R. Altered expression of miR-21, miR- 31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 72: 397-402, 2007.
90. BANDRÉS E, CUBEDO E, AGIRRE X, MALUMBRES R, ZÁRATE R, RAMIREZ N, ABAJO A, NAVARRO A, MORENO I, MONZÓ M, GARCIA-FONCILLAS J. Identification by realtime PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular Cancer*, 5: 29-39, 2006.
91. MICHAEL MZ, O'CONNOR SM, VAN HOLST PELLEKAAN NG, YOUNG GP, JAMES RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research*, 1: 882-891, 2003.
92. CHEN J, WANG BC, TANG JH. Clinical significance of microRNA-155 expression in human breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 106: 260-266, 2012.
93. NISHIDA N, YOKOBORI T, MIMORI K. MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 38:1437-1443, 2011.
94. FABER C, KIRCHNER T, HLUBEK F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch* 454:359-367, 2009.
95. ASLAM MI, TAYLOR K, PRINGER JH, JAMESON JS. MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer. *Br J Surg* 96: 702-710, 2009.
96. NAGEL R, LE SAGE C, DIOSDADO B, WAAL M, OUDE VRIELINK JA, BOLINJ A, MEIJER GA, AGAMI R. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res* 68: 5795-5802, 2008.
97. CIARDIELLO F, TORTORA G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*, 358: 1160-1174, 2008.

98. RASINSKAS AM. EGFR signaling in colorectal carcinomas. SAGE-Hindawi Access to Research Pathology Research International. doi:10.4061/2011/932932, 2011.
99. JOHNSON SM, GROSSHANS H, SHINGARA J, BYROM M, JARVIS R, CHENG A, LABOURIER E, REINERT KL, BROWN D, SLACK FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120: 635-647, 2005.
100. CHEN X, GUO X, ZHANG H, XIANG Y, CHEN J, YIN Y, CAI X, WANG K, WANG G, BA Y, ZHU L, WANG J, YANG R, ZHANG Y, REN Z, ZEN K, ZHANG J, ZHANG CY. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 28: 1385-1392, 2009.
101. AKAO Y, NAKAGAWA Y, NAOE T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 29: 903-906, 2006.
102. HE L, HE X, LOWE SW, HANNON GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*, 7: 819-822. 25, 2007.
103. HERMEKING H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*, 12: 414-418, 2007.
104. TAKAYAMA T, MIYANISHI K, HAYASHI T, SATO Y, NITSU Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*, 41: 185-192, 2006.
105. GABRIELY G, WURDINGER T, KESARI S, ESAU CC, BURCHARD J, LINSLER PS, KRICHEVSKY AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*, 28: 5369-5380, 2008.
106. ASANGANI IA, RASHEED SA, NIKOLOVA DA, LEUPOLD JH, COLBURN NH, POST S, ALLGAYER H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27: 2128-2136, 2008.
107. NATAWALA A, SPYCHAL R, TSELEPIS C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol*, 14: 3792-3797, 2008.
108. YU G, TANG JQ, TIAN ML, LI H, WANG X, WU T, ZHU J, HUANG SJ, WAN YL. Prognostic Values of the miR-17-92 Cluster and Its Paralogs in Colon Cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 106: 232-237, 2012.
109. DIOSDADO B, van de WIEL MA, TERHAAR SIVE DROSTE JS, MONGERA S, POSTMA C, MEIJERINK WJHJ, CARVALHO B, MEIJER GA. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *British Journal of Cancer*, 101: 707-714, 2009.
110. NAVARRO A, BEA S, FERNANDEZ V, PRIETO M, SALAVERRIA I, JARES P, HARTMANN E, MOZOS A, LOPEZ-GUILLERMO A, VILLAMOR N, COLOMER D, PUIG X, OTT G, SOLE F, SERRANO S, ROSENWALD A, CAMPO E, HERNANDEZ L. MicroRNA expression, chromosomal alterations, and immunoglobulin variable heavy chain hypermutations in Mantle cell lymphomas. *Cancer Res*, 69: 7071-7078, 2009.
111. LU S, WANG S, GENG S, MA S, LIANG Z, JIAO B. Increased Expression of microRNA-17 Predicts Poor Prognosis in Human Glioma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2012/970761
112. LIANG L, WONG CM, YING Q, FAN DN, HUANG S, DING J, YAO J, YAN M, LI J, YAO M, HE X. MicroRNA-125b suppressed human liver cancer cell

- proliferation and metastasis by directly targeting oncogene LIN28B2. *Hepatology*, 5: 1731-1740, 2010.
113. SCOTT GK, GOGA A, BHAUMIK D, BERGER CE, SULLIVAN CS, BENZ CC. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*, 282: 1479-1486, 2007.
 114. HENSON BJ, BHATTACHARJEE S, ODEE DM, FEINGOLD E, GOLLIN SM. Decreased expression of miR-125b and miR-100 in oral cancer cells contributes to malignancy. *Genes Chromosomes Cancer*, 48: 569-582, 2009.
 115. LI Z, GU X, FANG Y, XIANG J, CHEN Z. microRNA expression profiles in human colorectal cancers with brain metastases. *Oncology Letters*, 3: 346-350, 2012.
 116. YIN Y, YAN ZP, LU NN, XU Q, HE J, QIAN X, YU J, GUAN X, JIANG BH, LIU LZ. Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1829: 239-247, 2013.
 117. MICHAEL MZ, OCONNOR SMO, HOLST PELLEKAAN NG, YOUNG GP, JAMES RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res*, 1: 882-891, 2003.
 118. IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, VERONESE A, SPIZZO R, SABBIONI S, MAGRI E, PEDRIALI M, FABBRI M, COMPIGLIO M, MENARD S, PALAZZO JP, ROSENBERG A, MUSIANI P, VOLINIA S, NENCI I, CALIN GA, QUERZOLI P, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65: 7065-7070, 2005.
 119. KENT OA, MENDELL JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 25: 6188-6196, 2005.
 120. SHETTER AJ, LEUNG SY, SOHN JJ, ZANETTI KA, BOWMAN ED, YANAIHARA N, YUEN ST, CHAN TL, KWONG DL, AU GK, LIU CG, CALIN GA, CROCE CM, HARRIS CC. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 299: 425-436, 2008.
 121. MONZO M, NAVARRO A, BANDRES E, ARTELLS R, MORENO I, GEL B, IBEAS R, MORENO J, MARTINEZ F, DIAZ T, MARTINEZ A, BALAGUE O, GARCIA-FONCILLAS J. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res*, 18: 823-833, 2008.

7. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel ve manevi desteğini gördüğüm; bilgisi, karakteri ve yardımseverliği ile bana çok şey öğrettiğine inandığım, karşılaştığım her türlü sorunda benden, hoşgörü ve sabrını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan çok değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Berrin TUNCA' ya, eğitimime katkı sağlayan, yakın ilgi ve sabırlarını benden esirgemeyerek; bilgi ve tecrübelerini hoşgörü ile aktaran, değerli hocam Doç Dr. Gülşah ÇEÇENER' e, eğitime ve bilime önem veren, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman sevgi ve saygı ile anacağım değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ünal EGELİ' ye ve ayrıca Uludağ Üniversitesi'nde öğrencilik yaşamım boyunca bana emeği geçen değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda emeği geçen, her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi çok değerli hocam Prof. Dr. Tuncay YILMAZLAR' a teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan her zaman onur duyduğum, zorluklara birlikte göğüs gerdiğimiz, birçok sıkıntılı andan hoşluklar yaratmaya çalıştığımız; destek ve dostluklarını her zaman minnetle anacağım çok değerli çalışma arkadaşlarım Arş. Grv. Gülçin TEZCAN' a, yüksek lisans öğrencileri Elif ERTÜRK, Elif DEMİRDÖĞEN ve Adem ALEMDAR' a, biyolog Görkem UMUT' a ve ayrıca desteklerini hissettiğim tüm arkadaşlarıma, tezimin kaynaklar kısmında yer alan tüm araştırmacı ve yazarlara teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca birbirimize karşı saygı, sevgi ve yardımlarımızı hiçbir zaman esirgemediğimiz, bana verdikleri destek ve dostluklarını minnetle anacağım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' nın tüm personeline, Sağlık Bilimleri Enstitüsü sekreteri Lütfullah FIÇICI' ya, öğrenci işleri şefi Emine ÖZGÜRGEN' e, Gönül IŞIK' a ve tüm personele teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde destekçilerim olan, beni yetiştirip maddi ve manevi her sıkıntıda yardımına yetişen, hayatımın bugününü onlara borçlu olduğum sevgili aileme, sonsuz teşekkür ederim.

8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılı Bursa doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Atatürk İlköğretim Okulu'nda tamamladım. Bursa Anadolu Kız Lisesi'nden 2005 yılında mezun oldum. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Fen/Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne girdim ve 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Eğitimime halen devam etmekteyim.