T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OVER KANSERİNDE MİR-200 AİLESİNİN EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞDEKİ ROLÜ

Merve ŞENTÜRK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Temmuz, 2021

İSTANBUL

Bu çalışma, 14.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Tuba GÜNEL(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. E. Ş. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Hale GÖKSEVER ÇELİK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 35391 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

ÖNSÖZ

Eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, çalışma azmini örnek aldığım, eğitimimin her aşamasında desteğini hissettiğim, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu sabır ve hoş görüden dolayı değerli tez danışmanım ve saygı değer hocam Prof. Dr. Tuba GÜNEL'e;

Projemin örneklerini elde etmemde bana yardımcı olan Prof. Dr. Samet TOPUZ'a;

Hayallerimin peşimden gidebilmem için beni yüreklendiren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Dr. Emre ŞENTÜRK'e;

Yoğun çalışma temposunda tezim için izin almak zorunda olduğum zamanlarda desteklerini benden esirgemeyen Medipol Mega Hastanesi Patoloji Bölümü hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma;

Bilimsel çalışmalarda yanımda olan Arş. Gör. Ece GÜMÜŞOĞLU, Arş. Gör. İrem ALBAYRAK ve Zeynep KUMRAL'a;

Yaşamımın her döneminde destek ve sevgilerini benden esirgemeyen, varlıklarıyla bana güç veren canım aileme;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız.

Temmuz 2021 Merve ŞENTÜRK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xvii**
SUMMARY ..... **xix**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **5**
2.1. OVER ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ 5
2.2. OVER KANSERİ 7
2.2.1. Over Kanserinin Sınıflandırılması 7
2.2.2. Over Kanseri Evreleri 8
2.2.3. Over Kanseri Tanısı 10
2.2.4. Over Kanserinin Risk Faktörleri 10
2.2.4.1. Üreme Faktörleri 10
2.2.4.2. Jinekolojik Faktörler 11
2.2.4.3. Çevresel Faktörler 11
2.2.4.4. Genetik Faktörler 11
2.3. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER 13
2.3.1. Protein Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri 13
2.3.2. Gen Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri 13
2.3.2.1. Kalıtsal Gen Mutasyonları 13
2.3.2.2. Gen Anlatımı 14
2.3.2.3. Epigenetik Değişimler 14
2.4. MİKRORNA (MİRNA) 16
2.4.1. MiRNA Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri 16
2.4.2. MiRNA Biyosentezi 17
2.4.3. MiRNA Veritabanları 19
2.4.4. MiRNA'lar Tarafından Gen Anlatımının Düzenlenmesi 20

2.5. EPİTELYAL MEZENKİMAL TRANSİZYON (EMT) 21
2.5.1. EMT'nin Sınıflandırılması 22
2.5.1.1. İmplantasyon, Embriyogenez ve Organ Gelişiminde EMT 22
2.5.1.2. Doku Rejenerasyonu ve Organ Fibrozunda EMT 23
2.5.1.3. Kanser İlerlemesi ve Metastazda EMT 23
2.5.2. Metastaz Kaskadı 24
2.5.3. Polarite ve EMT 26
2.5.4. EMT'de Sinyal Yolakları 26
2.5.4.1. TGF-β Sinyal Yolağı 26
2.5.4.2. Wnt Sinyal Yolağı 27
2.5.4.3. Notch Sinyal Yolağı 28
2.5.5. EMT'yi Oluşturan Transkripsiyon Faktörleri 29
2.5.5.1. Snail Transkripsiyon Faktörleri 29
2.5.5.2. Bhlh Transkripsiyon Faktörleri 30
2.5.5.3. ZEB Transkripsiyon Faktörleri 30
2.5.6. RNA seviyesinde EMT Düzenlenmesi 33
3. MALZEME VE YÖNTEM 35
3.1. ÖRNEK ELDE ETME 35
3.2. OVER DOKUSUNDAN TOTAL RNA İZOLASYONU 35
3.3. MİRNA ANLATIM ANALİZİ 38
3.3.1. cDNA Sentezi 38
3.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 39
3.4. GEN ANLATIM ANALİZİ 40
3.4.1. cDNA Sentezi 40
3.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 41
3.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA 44
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 45
4. BULGULAR 46
4.1. MİRNA ANLATIM ANALİZİ 46
4.1.1. Kullanılan Örneklerin Özellikleri 46
4.1.2. Anlatım Analizi Sonuçları 48
4.2. BİYOLOJİK VERİ TABANLI YÖNTEMLER İLE MİRNALAR'IN HEDEF GEN TESPİTİ 51
4.3. GEN ANLATIM ANALİZİ 52
4.3.1 Örneklerin Kalite Kontrolü 53

4.3.2. Anlatım Analizi Sonuçları 55
4.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ 57
4.4.1. Örneklerin Kalite Kontrolü 57
4.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi 59
4.4.2. İmmunohistokimyasal İstatistiksel Analiz 65
4.5. KORELASYON ANALİZİ 67
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 69
KAYNAKLAR 77
EKLER 94
EK 1. Etik Kurul Karar Formu. 94
EK 1. Etik Kurul Karar Formu (devam). 95
ÖZGEÇMİŞ 97

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: Hsa-miR-200c-3p, ZEB1, E-kadherin ve Vimentine ait hipotez şeması. Tümör dokusundan elde edilen hsa-miR-200c-3p'nin, ZEB1 ekspresyonunu baskılayarak, over kanserinde e-kadherin ekspresyonunun artmasını ve vimentin ekspresyonunun azalmasını düzenlediği öne sürülen model. 4

Şekil 2.1: Kadın üreme organlarının şematik gösterimi. 5

Şekil 2.2: Over kesit yüzünün şematik gösterimi. 6

Şekil 2.3: Over kanserinin kökenleri ve sınıflandırılması. 8

Şekil 2.4: Over kanseri evreleri. 9

Şekil 2.5: Olgun miRNA oluşumu. 18

Şekil 2.6: Epitelyal mezenkimal transizyonun gösterimi. 22

Şekil 2.7: Metastaz kaskadı. 25

Şekil 2.8: ZEB ailesine ait transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonel alanlarını gösteren şematik diyagram. 31

Şekil 2.9: ZEB1'in invazyon ve metastazdaki süreci. EMT uyarıcı sinyaline yanıt olarak, ZEB1 seviyesi, invaziv kanser hücreleri veya yakınındaki invaziv hücrelerde artar. Artan ZEB1 ekspresyonu primer tümörün çevresindeki hücrelerde adezyon kaybına, ekstraselüler matriksin bozulmasına ve vaskülojenik taklit oluşumuna neden olur. Metastatik hücreler primer tümörden uzaklaştıkça, ZEB1 ekspresyonu azalır. 32

Şekil 2.10: miR-200 ailesi üyeleri. 33

Şekil 2.11: miR-200 ailesi ile ZEB1 ve ZEB2 arasında çift yönlü negatif geri bildirim mekanizması. 34

Şekil 4.1: Hsa-miR-200c-3p'nin amplifikasyon eğrileri ve rölatif miktar grafikleri. 48

Şekil 4.2: Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserli ve sağlıklı dokulardaki anlatımını gösteren box plot grafiği. 49

Şekil 4.3: Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserini öngörmedeki ROC eğrisi analizi. 50

Şekil 4.4: Hsa-miR-200c'nin genomdaki lokalizasyonu. 51

Şekil 4.5: Hsa-miR-200c-3p'nin hedeflediği ZEB1 geninin web görüntüsü (miRDB). 53

Şekil 4.6: ZEB1 geninin amplifikasyon eğrileri ve rölatif miktar grafikleri.....55

Şekil 4.7: ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserli ve sağlıklı dokulardaki anlatımını gösteren box plot grafiği.....56

Şekil 4.8: ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserini öngörmedeki ROC eğrisi analizi. 57

Şekil 4.9: ZEB1 antikoruna ait pozitif kontrol dokusunun (insan endometriumu) immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüsü. 58

Şekil 4.10: E-kadherin antikoruna ait pozitif kontrol dokusunun (insan meme kanseri) immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüsü. 58

Şekil 4.11: Vimentin antikoruna ait pozitif kontrol dokusunun (insan derisi) immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüsü. 59

Şekil 4.12: ZEB1 proteinin immunhistokimyasal boyama görüntüleri. ZEB1 proteininin sağlıklı over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örnekleridir (A,B,C). ZEB1 proteininin kanserli over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örnekleridir (D,E,F). 63

Şekil 4.13: E-kadherin proteinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri. E-kadherin proteininin kanserli over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (A). E-kadherin proteininin sağlıklı over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (B).....64

Şekil 4.14: Vimentin proteinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri. Vimentin proteininin sağlıklı over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (A). Vimentin proteininin kanserli over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (B).....64

Şekil 4.15: ZEB1, E-kadherin ve Vimentin proteinlerinin over kanserli ve sağlıklı dokulardaki boyanma miktarlarını gösteren "box plot" grafikleri. Parametrik olmayan veriler "Mann Whitney U" testi ile karşılaştırıldı ve medyan (25 persentil – 75 persentil) olarak ifade edildi. ZEB1 proteininin immunohistokimyasal yöntemle boyanma miktarlarının sağlıklı over dokularında 3(2-4), tümörlü over dokularında 6(5-6) olduğunu gösteren grafik (A). E-kadherin proteininin immunohistokimyasal yöntemle boyanma miktarlarının sağlıklı over dokularında 3(2-4), tümörlü over dokularında 5(5-6) olduğunu gösteren grafik (B). Vimentin proteininin immunohistokimyasal yöntemle boyanma miktarlarının sağlıklı over dokularında 6(5-6), tümörlü over dokularında 4(4-5) olduğunu gösteren grafik (C). 66

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Over Kanserinde miRNA Biyobelirteçleri. 17

Tablo 2.2: MiRNA web siteleri. 20

Tablo 3.1: Örnek miktarına göre kullanılması gereken "Lysis Buffer" miktarları....37

Tablo 3.2: Elüsyon parametreleri. 37

Tablo 3.3: Çalışma çözeltisi ve reaksiyon bileşenleri. 38

Tablo 3.4: cDNA sentezi termal döngü. 39

Tablo 3.5: Reaksiyon bileşenleri ve kullanım miktarları....39

Tablo 3.6: Termal döngü protokolü. 40

Tablo 3.7: Reaksiyon bileşenleri ve kullanım miktarları....41

Tablo 3.8: cDNA sentezi termal döngü. 41

Tablo 3.9: ZEB1 geni için tasarlanan primerler. 42

Tablo 3.10: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli bileşenler ve kullanım miktarları. 42

Tablo 3.11: Termal döngü protokolü. 43

Tablo 3.12: İmmunohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar ve özellikleri. 44

Tablo 4.1: Over kanserli hastaların demografik ve klinik bilgileri. 47

Tablo 4.2: Hsa-miR-200c-3p'nin bağımsız örneklem t test sonuçları. 49

Tablo 4.3: Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserini öngörmedeki ROC analizi sonuçları. 50

Tablo 4.4: miR-200 aile üyelerinin miRBase erişim bilgileri. 51

Tablo 4.5: Hsa-miR-200c-3p'nin hedeflemiş olduğu ilk 10 gen. 52

Tablo 4.6: Sağlıklı ve over kanserli doku örneklerinin kantitasyon sonuçları. 54

Tablo 4.7: ZEB1 genine ait mRNA bağımsız örneklem t test sonuçları. 56

Tablo 4.8: ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserini öngörmedeki ROC analizi sonuçları. 56

Tablo 4.10: ZEB1 antikorunun immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları. 60

Tablo 4.11: E-kadherin antikorunun immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları. 61

Tablo 4.12: Vimentin antikorunun immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları. 62

Tablo 4.13: ZEB1, Vimentin ve E-kadherin proteinlerinin Mann Whitney U testi sonuçları. 65

Tablo 4.14: Hsa-miR-200c-3p, ZEB1 mRNA, ZEB1 proteini, E-kadherin proteini ve Vimentin proteininin Spearman korelasyon analizi sonuçları.....67

Tablo 5.1: Hsa-miR-200c-3p'nin katıldığı biyolojik yolaklar ve hedeflediği genler. 70

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
Ca	: Kalsiyum
Cm	: Santimetre
g	: Relative Centrifugal Field
kDa	**:** Kilodalton
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
nM	: Nanomolar
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
^{o}C	**:** Santigrat derece
=	**:** Eşit
±	: Artı/eksi
+	: Artı
-	: Eksi
x	: Çarpı
<	: Küçük
>	: Büyük

Kısaltmalar **Açıklama**

ΔΔCt : "Comparative Ct"
ABD : Amerika Birleşik Devletleri
AGO : "Argonaute"
AKT2 : "RAC-beta serine/threonine-protein kinase"
ALK1 : "Activin receptor-like kinase 1"
ALK2 : "Activin receptor-like kinase 2"
ALK3 : "Activin receptor-like kinase 3"
ALK6 : "Activin receptor-like kinase 6"
AUC : "Area under the ROC curve"
AJCC : "The American joint committee on cancer"
AZ : Arizona
bHLH : "Basic helix–loop–helix"
BMP : "Bone morphogenetic protein"
BRCA1 : "Breast cancer gene 1"
BRCA2 : "Breast cancer gene 2"
BRG1 **: "**Brahma related gene 1"
BSO **:** Bilateral salfingooferektomi
BT **:** Bilgisayarlı tomografi
BZP **:** "β-cell Zf protein"
CA : California
CA125 : "Cancer antigen 125"
CA19-19 : "Cancer antigen 19-9"
CCC : "Clear cell carcinoma"
CDC42 : "Cell division cycle 42"
CDH1 : "Cadherin 1"
CEA : "Carcinoembryonic antigen"
CI : "Confidence interval"
Co-SMADs : "Common partner smads"
CSL : "Cellulose synthase-like"
Ct : "Cycle treshold"
CtBP : "C-terminal binding protein"
DAB : "3,3'-Diaminobenzidine"
DGCR8 : "Digeorge syndrome critical 8"

dsRBD : Çift iplikli RNA bağlanma alanı
DVL : “Dishevelled”
EC : “Endometrioid carcinoma”
EGF : “Epidermal growth factor”
E-Kadherin : Epitelyal kadherin
EMT : Epitelyal mezenkimal transizyon
EOK : Epitelyal over kanseri
ERRFI1 : “ERBB receptor feedback inhibitor 1”
FGF : “Fibroblast growth factor”
FIGO : “The international federation of gynecology and obstetrics”
FOXC2 : “Forkhead box protein C2”
FOXQ1 : “Forkhead box Q1”
Fz : “Frizzled”
GAPDH : “Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”
HGF : “Hepatocyte growth factor”
HGSC : “High grade serous carcinoma”
HIF : “Hypoxia inducible factor”
HIPK3 : “Homeodomain interacting protein kinase 3”
IBM : “International business machines”
IL-2 : İnterlökin-2
IL-2a : İnterlökin-2a
I-SMADs : “Inhibitory smads”
KLF8 : “Kruppel like factor 8”
LEF : “Lymphoid enhancer factor”
LGSC : “Low grade serous carcinoma”
LRP5/6 : “Lipoprotein receptor-related protein 5/6”
MAP2 : “Microtubule associated protein 2”
MC : “Mucinous carcinoma”
MET : Mezenkimal epitelyal transizyon
MH2 : “MAD homology 2”
miRISC : “miRNA-loaded RNA-induced silencing complex”
miRNA : Mikro RNA
MMP1 : “Matrix metalloproteinase-1”
MMP2 : “Matrix metalloproteinase-2”

MR : Manyetik rezonans
mRNA : “Messenger RNA”
MUC1 : “Mucin-1”
NF-AT : “Nuclear factor of activated T-cells”
NICD : “Notch intracellular domain”
N-kadherin : Nöral kadherin
NR5A2 : “Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2”
NuRD : “Nucleosome remodeling deacetylase”
PACT : “Protein kinase R activating protein”
PAZ : “Piwi-argonaute-zwille”
PET : Pozitron elektron tomografisi
piRNA : “The PIWI-interacting RNA”
RAC : “Rho family of GTPases”
RECK : “Reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs”
RhoA : “Ras homolog family member A”
ROC : “Reciever operating characteristic”
R-SMADs : “Receptor regulated smads”
SIP1 : “Smad interacting protein 1”
siRNA : “Small interfering RNA”
SLIT2 : “Slit guidance ligand 2”
SNAI1 : “Snail family transcriptional repressor 1”
SNAI2 : “Snail family transcriptional repressor 2”
SOX : “Sex determining region Y box transcription factor”
SPSS : “Statistical package for the social sciences”
TAH : Total abdominal histerektomi
TCF : “T-cell factor”
TGF : “Tumor growth factor”
TGF-β : “Tumor growth factor-β”
TGF-βRI **: “**Tumor growth factor-β receptor I”
TGF-βRII **: “**Tumor growth factor-β receptor II”
TRBP : “Trans-activation-responsive RNA-binding protein”
TWIST1 : “Twist family BHLH transcription factor 1”
TWIST2 : “Twist family BHLH transcription factor 2”
UICC : “The union for international cancer control”

VASH2 : “Vasohibin 2”

VEGF : “Vascular endothelial growth factor”

WHO : “World health organization”

WIPF1 : “WAS/WASL interacting protein family member 1”

WNT : “Wingless”

XPO5 : “Exportin 5”

ZEB1 : “Zinc finger E-box binding homeobox 1”

ZEB2 : “Zinc finger E-box binding homeobox 2”

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OVER KANSERİNDE MİR-200 AİLESİNİN EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞDEKİ ROLÜ

Merve ŞENTÜRK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Over kanseri, jinekolojik malignitelerin en ölümcül olanıdır. Tarama yönteminin olmaması ve erken evrede asemptomatik olması nedeniyle, hastalık ileri evrelerde teşhis edilebilir. Over kanserindeki ölümlerin başlıca nedeni ileri evrelerde yaşanan uzak metastazlardır. Metastaz ise epitel fenotipten mezenkimal fenotipe (EMT) geçiştir. Hastalığın başlangıcı ve progresyonunun moleküler genetiği hakkında nispeten az şey bilinmektedir.

Tez kapsamında, epitelyal over kanserli hastalarda miRNA'ların epitelyal mezenkimal geçiş ile ilişkisini gösterebilmek ve erken tanı için metastaz mekanizmasını aydınlatabilmek amacıyla miRNA'ların hedef genleri ve bu genlerin düzenlenmesi ile anlatımları değişen proteinler incelenmiştir.

MikroRNA'lar (miRNA), kodlanmayan, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, düzenleyici gen sınıfında yer alan tek iplikli RNA dizileridir. Hedef mRNA'larına bağlanarak, translasyonel baskılamaya yol açar veya mRNA'nın stabilitesini azaltırlar. Hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, apoptoz, stres direnci ve yağ metabolizması dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri kontrol ederler. Bazı miRNA'lar onkojenik veya tümör baskılayıcı aktiviteye sahiptirler. Farklı kanserlerdeki miRNA ekspresyon profilleri benzersizdir. Bu da bazı miRNA'ların tanısal ve prognostik belirteçler olarak kullanılabileceğinin önemli bir göstergesidir.

Epitel hücrelerinin mezenkimal hücrelere dönüşümü, embriyonik gelişimde, kanser hücrelerinin çoğalması ve metastazında önemli bir rol oynar. Epitelyal-mezenkimal transizyon (EMT) geçiren hücreler epitel özelliklerini kaybederler. Hücre iskeletleri yeniden düzenlenir. Hücreler arası bağlantı proteinleri ve mezenkimal belirteçlerle birlikte birçok molekülün aşağı ve yukarı regülasyonu sağlanarak hareketli bir fenotip kazanırlar.

Tez kapsamında epitelyal-mezenkimal geçişte rol oynadığı düşünülen hsa-miR-200c-3p'nin sağlıklı ve ileri evre epitelyal over kanserli bireylerin dokuları kullanılarak anlatım analizi yapılmıştır. Over kanserli bireylerde hsa-miR-200c-3p'nin anlatımının büyük oranda arttığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Hsa-miR-200c-3p'nin hedeflediği genler "insilico" yöntemlerle tespit edilmiş ve bu hedef genlerden biri olan ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1)'in sağlıklı ve ileri evre kanserli over dokularında gen anlatım analizi yapılmıştır. ZEB1 mRNA'sının gen anlatımı, kanserli dokularda sağlıklılara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır ($p<0,05$). Yapılan korelasyon analizi sonucunda hsa-miR-200c-3p ile ZEB1 geni arasında negatif yönde güçlü korelasyon tespit edilmiştir ($r=-0,75$; $p<0,001$). Bunların yanı sıra ZEB1 proteini ve EMT'de rol aldığı düşünülen proteinler olan vimentin ve e-kadherin'in sağlıklı ve over kanserli dokulardaki yüzey antijenleri immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda ZEB1 ve e-kadherin'in kanserli dokulardaki boyanma yoğunluğu ve yaygınlığının sağlıklılara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Buna karşılık vimentin proteininin kanserli dokularda boyanma yoğunluğu ve yaygınlığının azaldığı gösterilmiştir ($p<0,05$). ZEB1 mRNA'sı ve proteinin arasında pozitif yönde bir korelasyon tespit edilememiştir.

Hsa-miR-200c-3p'nin, hedef geni olan ZEB1'in promotör bölgesine bağlanarak anlatımını baskıladığını ve miktarı azalan ZEB1'in de e-kadherini kodlayan CDH1 genine yeterince bağlanamadığını ve e-kadherin miktarında artış olabileceği hipotezini öne sürmekteyiz. Over kanserli dokularda mezenkimal biyobelirteç olan vimentin proteininin azalan miktarı mezenkimalden epitele geçiş için uyumlu bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre, hsa-miR-200c-3p'yi over kanseri tanısında yeni bir aday biyobelirteç olarak tanımlayabiliriz.

Temmuz 2021, 117 sayfa.

Anahtar kelimeler: miRNA, epitelyal-mezenkimal transizyon, over kanseri.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE ROLE OF THE MIR-200 FAMILY IN EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN OVARIAN CANCER

Merve ŞENTÜRK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Tuba GÜNEL

Ovarian cancer has the highest mortality among gynecological cancers. The lack of a screening method and being asymptomatic at an early stage cause the disease to be diagnosed in advanced stages. The main cause of deaths from ovarian cancer is distant metastasis in advanced stages. Metastasis is the transition of cells from epithelial phenotype to mesenchymal phenotype (EMT). Relatively little is known about the molecular genetics of disease onset and progression.

Within the scope of the thesis, the target genes of one specific microRNA (miRNA) and the proteins whose expressions are changed by the regulation of these genes were examined. The aim is to show the relationship of miRNAs and the epithelial mesenchymal transition process in patients with epithelial ovarian cancer and to elucidate the metastasis mechanism for early diagnosis.

MiRNAs are non-coding small RNAs about 22 nucleotides long, single-stranded RNA sequences that belong to the regulatory gene sequences. By binding to target mRNAs, they lead to translational suppression or decrease the stability of the mRNA. They control a variety of biological processes, including cell differentiation, cell proliferation, apoptosis, stress resistance, and fat metabolism. Some miRNAs have oncogenic or tumor suppressor activity. The miRNA expression profiles differ in different cancer types. Therefore, some miRNAs can be used as diagnostic and prognostic markers of various cancer types

The transformation of cells from epithelial to mesenchymal characteristics plays an important role in embryonic development, proliferation, and metastasis of cancer cells. Cells undergoing epithelial-mesenchymal transition (EMT) lose their epithelial properties. Cell skeletons are rearranged. They acquire a motile phenotype by up and down regulation of many molecules including intercellular junction proteins and mesenchymal markers.

Within the scope of this thesis, the gene expression analysis of hsa-miR-200c-3p, which is a miRNA considering to play a role in the epithelial-mesenchymal transition, has been performed using the ovarian tissues obtained from healthy individuals and advanced epithelial ovarian cancer patients. It has been shown that the expression of hsa-miR-200c-3p was significantly increased in ovarian cancer patients ($p < 0.05$). The genes targeted by hsa-miR-200c-3p were determined by in-silico methods and gene expression analysis of one of these target genes, which is ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1), was performed in healthy and advanced stage cancerous ovarian tissues. The expression of ZEB1decreased significantly ($p < 0.05$) in cancerous tissues compared to healthy ones. As a result of the correlation analysis, a strong negative correlation was found between hsa-miR-200c-3p and the ZEB1 gene ($r=-0,75$; $p<0,001$). In addition, immunohistochemical analysis of ZEB1 protein and vimentin and e-cadherin cell surface antigens has been performed, in healthy and ovarian cancer tissues because they are considered to play a role in EMT, as a result of immunohistochemical staining, the staining intensity and prevalence of ZEB1 and e-cadherin proteins were higher in cancerous tissues than healthy ones ($p < 0.05$). However, it has been showed that the intensity and extent of staining of vimentin protein decrease in cancerous tissues ($p < 0.05$). There was no positive correlation between ZEB1 mRNA and protein.

We hypothesize that hsa-miR-200c-3p binds to the promoter region of its target gene, ZEB1, and suppresses its expression. Thus, the expression of ZEB1 decreased and ZEB1 cannot sufficiently bind to the mRNA of e-cadherin coding gene, CDH1, and as a result, the expression of e-cadherin increased. The decreasing level of vimentin protein, a mesenchymal biomarker in ovarian cancer tissues, was found to be compatible with the transition from mesenchymal to epithelial. According to our results, we suggest that hsa-miR-200c-3p as a novel candidate biomarker in the diagnosis of ovarian cancer.

July 2021, 117 pages.

Keywords: miRNA, epithelial-mesenchymal transition, ovarian cancer.

1. GİRİŞ

Over kanseri, jinekolojik kansere bağlı gelişen ölümlerin en sık nedenidir [1]. Ölüm oranlarının yüksek olmasının temel nedeni hastalığın erken evrelerde semptom göstermemesidir. Semptomsuz ilerleyen hastalığın bu özelliği onu, metastatik kılar. Dünya'da 2020 yılında hastalığın insidans oranları 100.000 kişi başına ortalama 6.6, ölüm oranları ise 4.4'tür [2]. Over kanserlerinin yaklaşık %70'i ileri evrelerde teşhis edilir. Teşhis edilen hastaların 5 yıllık sağ kalım oranı %30'dur [3]. Primer over tümörlerinin %90'ı epitelyal kökenlidir. Tümörün, overin yüzey epitelinden ya da yüzey epitel inklüzyon kistlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir [4]. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) epitelyal over kanserlerini (EOK); seröz tümörler, endometrioid tümörler, müsinöz tümörler, seromüsinöz tümörler, berrak hücreli karsinomlar ve Brenner tümörleri olarak alt sınıflara ayırmıştır. Bunlardan en sık görüleni seröz tümörlerdir [5].

Hastaların ileri evrelerde oldukça zorlu süreçlerden geçtiği over kanserinde, hastalığın moleküler patogenezini daha iyi anlamaya yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Kanserin erken teşhisini kolaylaştıran yeni biyobelirteçler ve ilaç hedefleri geliştirmek üzere bilimsel çalışmalar hız kazanmıştır.

Kanser sebebiyle yaşanan ölümlerin temel nedeni primer lezyonlar değil genellikle ileri evrelerde yaşanan uzak metastazlardır. Metastaz ise epitel fenotipten mezenkimal fenotipe geçiş olarak tanımlanır. Epitelyal mezenkimal transiyon (EMT) olarak adlandırılan bu süreç, metastaz dışında embriyonik gelişim ve yara iyileşmesinde de yer alır. EMT'den önce hareketsiz ve bazal membrana muntazam bir şekilde dizilmiş olan polarize epitel hücreleri, EMT esnasında bazal membrana hasar veren, çevre dokulara yayılan, uzak doku ve organlara göç edebilen mezenkimal özellik kazanırlar. Bazal membrandan geçmelerine izin veren proteazların ekspresyonlarını arttırarak daha malign hale gelirler [6].

MikroRNA'lar, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, mRNA'ların translasyonu ve degradasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan, kodlanmayan RNA gen sınıfıdır [7]. MiRNA'lardan her birinin birden fazla hedefi bulunmaktadır. Bu durum onları tümör metastazı ve farklılaşması gibi karmaşık süreçlerin önemli düzenleyicileri yapar. Her mikroRNA, hedef genlerin düzenleyici bölgelerinde yer alan tamamlayıcı dizilere bağlanan 6-8 nükleotitlik spesifik diziye sahiptir [8]. MikroRNA'ların onkojen [9, 10] veya tümör baskılayıcı [11, 12]

olarak hareket ettiğini gösteren çalışmalardan sonra mikroRNA ve insan kanserleri arasında önemli bağlantılar kurulmuştur.

Epitel hücreleri; sıkı bağlantı kompleksi, hücre-hücre adhezyon kompleksi ve desmozomlar olarak bilinen çeşitli bağlantı yapıları ile sıkıca birbirlerine bağlıdırlar. Kadherinler, epitel hücrelerinin birbiri ile bağlantılı olmasını sağlayan adhezyon molekülleridir [13]. Kadherin süper ailesi 80 üyeden oluşur. E-kadherin (epitelyal kadherin) ise kadherin ailesinin bir üyesidir [14]. Hücre-hücre adhezyonundan sorumludur. E-kadherin, α-katenin ve β-katenin gibi membran proteinleri aracılığıyla hücre iskeleti elemanı olarak görev yapan aktine bağlanır. Hücre içerisinde e-kadherin-katenin kompleksinde yaşanan herhangi bir bozulma hücre adhezyon kaybına neden olur. Bu sebeple e-kadherin ile dolaylı yoldan etkileşime giren genlerde meydana gelebilecek mutasyonlar bile e-kadherin yoluyla gerçekleşen hücre adhezyonunu etkileyebilir [15]. EMT'deki ilk adımlardan biri, e-kadherin fonksiyonundaki kayıptır. EMT'ye sebep olan faktörlerin, e-kadherin fonksiyonunu bozarak veya ekspresyonunu değiştirerek epitelyal yeniden yapılanmayı başlattığı kabul edilmektedir [16].

Hücre iskeleti; hücrenin biyokimyasal ve fiziksel olarak dış ortamla ilişki halinde olmasını sağlar [17]. Vimentin ise hücre iskeletini oluşturan ara filament ailesinin bir üyesidir. Mezenkimal hücrelerde eksprese edilir. Ekspresyonunun değişmesi malignite ile ilişkilidir. Prostat kanseri, akciğer kanseri, melanom ve meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde kötü prognoza sebebiyet verir [18, 19]. Kanser tedavisi için potansiyel bir hedef olabilir. Over kanserinde vimentin ekspresyonu ile ilgili literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Mezenkimal karakterde olduğu için EMT'de ekspresyonunun arttığı düşünülmektedir.

Tezin amacı, epitelyal over kanserli hastalarda miRNA'ların epitelyal mezenkimal geçiş ile ilişkisini gösterebilmek ve erken tanı için metastaz mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olmaktır. EMT aracılı kanserin ilerlemesi ve metastazı miRNA'lar yoluyla düzenlenir. EMT'yi inhibe eden ve epitel hücre fenotipini kalıcı hale getiren miRNA'lardan biri miR-200 ailesidir. MiR-200 ailesinin, EMT indükleyici hedef mRNA'ları ZEB1 (Zinc finger E-box binding homeobox 1) ve ZEB2 (Zinc finger E-box binding homeobox 2) genleridir. ZEB ailesi, EMT sürecinin önemli bir belirteci ve hücreler arası adhezyon molekülü olan E-kadherini baskılama özelliklerine sahiptir. Aynı zamanda ZEB proteinleri, mikroRNA-200 (miR-200) ailesinin transkripsiyonel baskılayıcılarıdır. Böylelikle ZEB proteinleri ve miR-200 ailesi arasında negatif geri bildirim mekanizması olabileceği düşünülmektedir [6, 20, 21]. Vimentin ise EMT

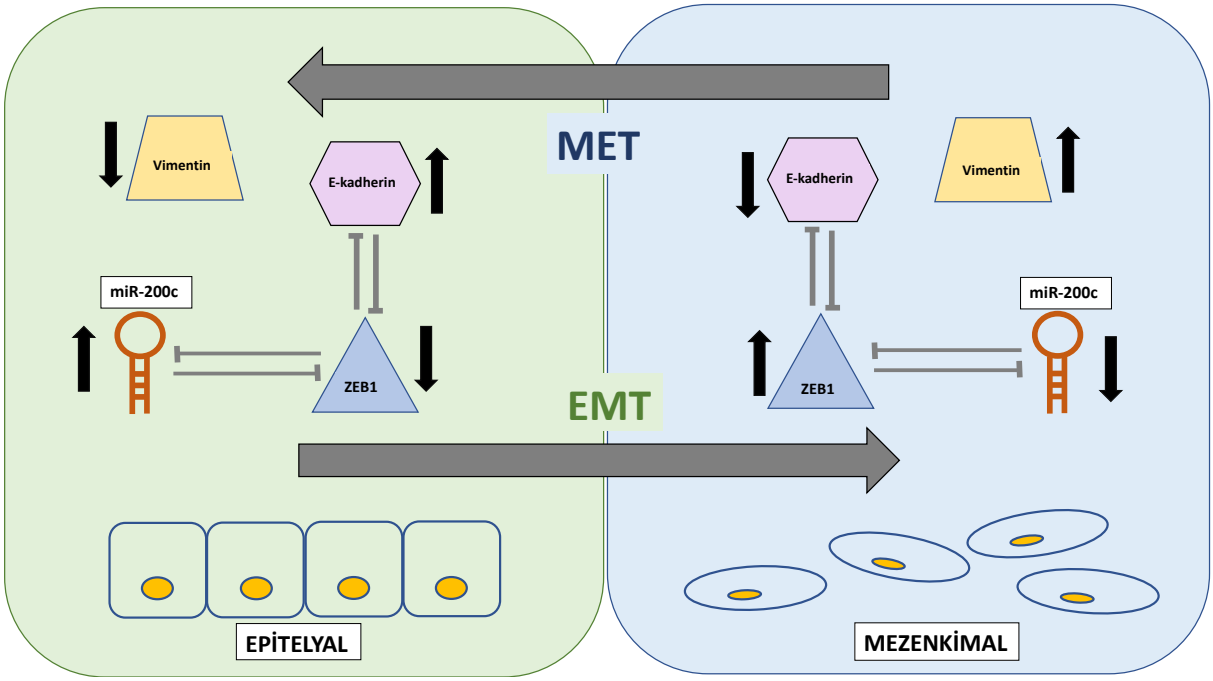
sürecinin mezenkimal belirteçlerinden biridir. Hücrelerin epitel karakterden mezenkimale geçtiği süreçte ekspresyonunun arttığı düşünülmektedir. ZEB1 ve hsa-miR-200c-3p döngüsünün araştırılması EMT geliştirebilen kanser türlerinin tedavisinde önemli bir gelişme olabilir. Bunun yanı sıra EMT'de miRNA'ların rol alması, kanser metastazının nasıl ortaya çıktığını daha iyi anlamamızı sağlayacak ve bu miRNA'ları hedefleyerek, terapotik ajanlar olarak kanser tedavisi için yeni yollar geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Tez kapsamında, biyobelirteç olarak MiR-200 ailesi mikroRNA'larından hsa-miR-200c-3p'nin over kanserinde EMT sürecine dahil olup olmadığını tespit etmeyi hedeflemekteyiz. EMT'de rol alan miRNA'lardan hsa-miR-200c-3p ve onun hedef genlerinden biri olan ZEB1'in sağlıklı ve tümörlü over dokularındaki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çalışma için 15 sağlıklı, 15 kanserli insan over dokuları ile çalışılmıştır. Dokular, gerekli izolasyon basamaklarından geçirilip total RNA elde edilmiştir. İzole edilen RNA'ların bir kısmı mRNA çalışması için cDNA'ya, diğer kısmı ise miRNA çalışması için cDNA'ya çevrilmiştir. Hsa-miR-200c-3p primeri kullanılarak cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yapılmış ve miRNA'nın gen anlatım analizi sağlıklı ve kanserli over dokularında karşılaştırılmıştır. ZEB1'in ekspresyon analizi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için Excel ve "IBM SPSS Versiyon 22" yazılımları kullanılmıştır. Aynı hastalardan alınan ikinci doku örnekleri ise %10 nötral tamponlu formalinde fikse edilmiş, doku takibi aşamasından geçirilmiş ve dokular parafine gömülmüştür. İmmunohistokimyasal boyama için parafin bloklardan lam üzerine doku kesitleri alınmıştır. Elde edilen kesitlere ZEB1, Vimentin ve E-kadherin antikorları kullanılarak immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Boyama sonuçları ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarının istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için "Mann Whitney U Test" kullanılmıştır. Sonuçların biyoistatistiksel olarak duyarlılık ve özgüllük analizleri için "Reciever Operating Characteristic" (ROC) yöntemi kullanılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda hsa-miR-200c-3p'nin anlatımı kanserli dokulara göre 182,35 kat artmış hedef genlerinden biri olan ZEB1 mRNA'sının anlatımı ise kanserli dokularda sağlıklı dokulara göre 0,32 kat azalmıştır. Over kanserli dokularda hsa-miR-200c-3p ve ZEB1 mRNA ekspresyonlarındaki korelasyonu göstermek için "Spearman korelasyon katsayısı" kullanılmıştır. Hsa-miR-200c-3p ve ZEB1 arasında negatif yönde güçlü anlamlı korelasyon olduğu tespit edilmiştir. İmmunohistokimyasal boyama sonuçlarından vimentinin anlatımı

kanserli dokularda 4 (4-5), sağlıklılara 6 (5-6) göre anlamlı azalmış, e-kadherin ise kanserli dokularda 5 (5-6), sağlıklılara 3 (2-4) göre anlamlı artmıştır ($p<0,001$). ZEB1'in immunohistokimyasal analiz sonuçları ise kanserli over dokularında sağlıklılara göre artmıştır. Bu sonuç ile ZEB1'in mRNA ekspresyon analiz sonuçları arasında negatif yönlü korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

Sonuçlarımız miR-200 ailesi üyelerinden biri olan hsa-miR-200c-3p'nin, ZEB1 ekspresyonunu baskılayarak, over kanserinde e-kadherin ekspresyonunun artmasına yardımcı olabileceği hipotezini desteklemektedir. Over kanserli dokularda, epitelyal biyobelirteç olan e-kadherin ekspresyonunun artması ve mezenkimal biyobelirteç olan vimentin ekspresyonunun azalması over karsinogenezinin mezenkimalden epitele geçiş modeli ile uyumlu olabileceğini göstermektedir. Hsa-miR-200c-3p'nin over karsinogenezinde rol aldığını ve epitelyal over kanserinde yeni bir biyobelirteç aynı zamanda terapötik hedefler sunabileceğini göstermektedir. Şekil 1.1.'de hsa-miR-200c-3p, ZEB1, E-kadherin ve Vimentine ait hipotez şeması gösterilmiştir.



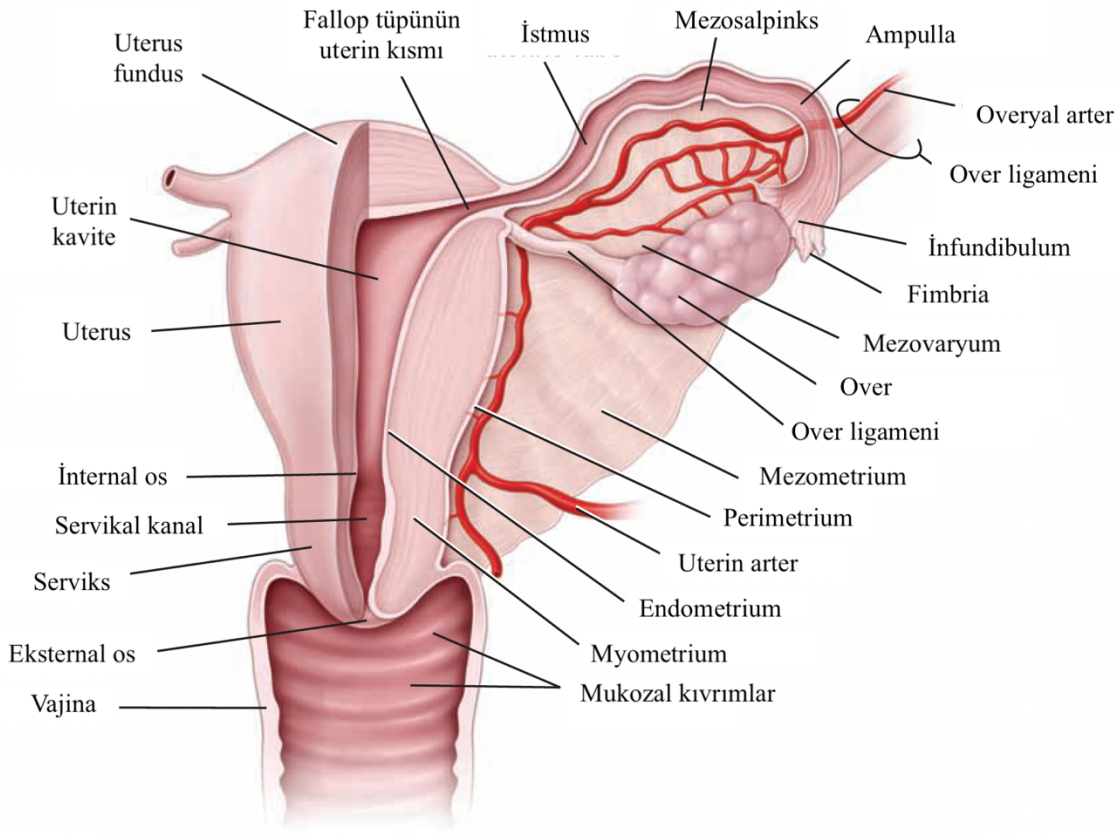
Şekil 1.1: Hsa-miR-200c-3p, ZEB1, E-kadherin ve Vimentine ait hipotez şeması. Tümör dokusundan elde edilen hsa-miR-200c-3p'nin, ZEB1 ekspresyonunu baskılayarak, over kanserinde e-kadherin ekspresyonunun artmasını ve vimentin ekspresyonunun azalmasını düzenlediği öne sürülen model.

2. GENEL KISIMLAR

2.1.OVER ANATOMİ VE HİSTOLOJİSİ

Overler, uterusun iki yanında ve rektumun önünde konumlanmış, halk arasında yumurtalık adı ile bilinen dişi genital organlardır. Şekilleri ovaldir. Yaklaşık 3-5 cm boyunda, 1,5-3 cm eninde ve 0,6-1,5 cm yüksekliğindedirler. Ortalama ağırlıkları 5-8 gramdır. Erken yaşlarda overlerin dış yüzü düzgün ve açık pembe renkli bir yapıya sahipken ileri yaşlarda kıvrımlı bir yapı sergiler [22].

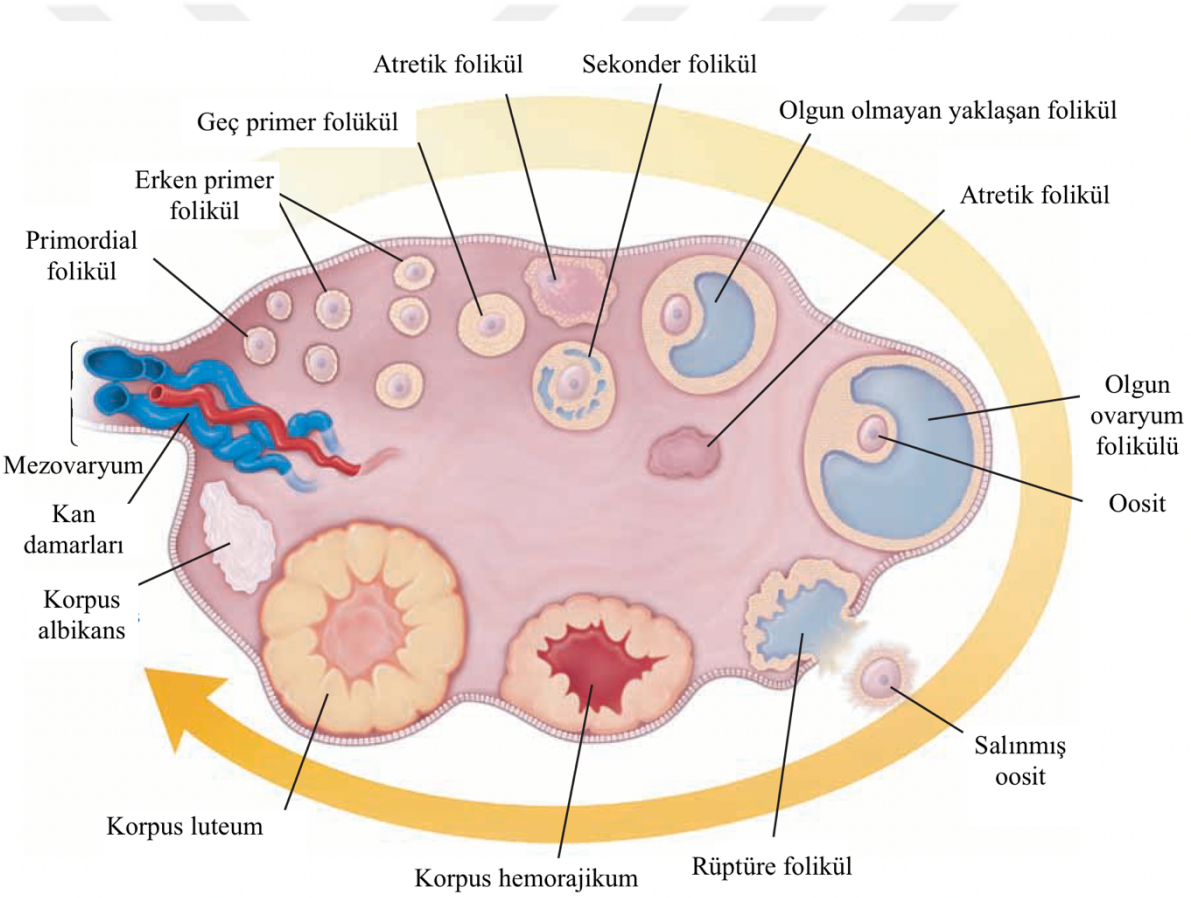
Overler pelvik boşlukta yer alır. Ligamentler aracılığıyla uterus ve pelvik duvara bağlanırlar. Enine kesitlerinde sıklıkla, içi berrak sıvı ile dolu foliküler kistler, beyaz-krem renkli korpus albikans ve sarı renkli korpus luteum dikkati çeker [23]. Overlerin anatomik yerleşimi Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Kadın üreme organlarının şematik gösterimi [24].

Over, kesit yüzü iki farklı yapı içerir. Bunlara korteks ve medulla adı verilir. Medullar bölge overin merkezinde yer alır. Gevşek bağ dokusu, sinir hücreleri, kan damarları, lenfatik damarlar içerir. Korteks ise periferde yer alan, medullayı çevreleyen bölgedir. Hücresel bakımdan zengin bağ doku içerisine gömülmüş şekildeki yumurtalık foliküllerini içerir. Foliküllerin etrafındaki stromada kas lifleri bulunur. Korteks ve medulla arasında keskin bir sınır yoktur [24].

Over yüzeyi tek tabakalı kübik epitel ile örtülüdür. Germinal epitelyum adı verilen bu hücresel tabaka, mezovaryumu kaplayan mezotel ile devam eder. Germinal epitel ve altındaki korteks arasında yoğun bir bağ doku tabakası olan tunika albuginea yer alır [24]. Şekil 2.2'de over kesit yüzü şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Over kesit yüzünün şematik gösterimi [24].

2.2. OVER KANSERİ

Dünya genelinde 2020 yılında 313.959 kişiye over kanseri tanısı koyulmuş ve bu kişilerin 207.252'si hayatını kaybetmiştir [2]. Over kanseri, kadınlarda en yaygın görülen 7. kanser olmakla birlikte kadınlar arasında kanserden ölüme neden olan 8. kanserdir [25].

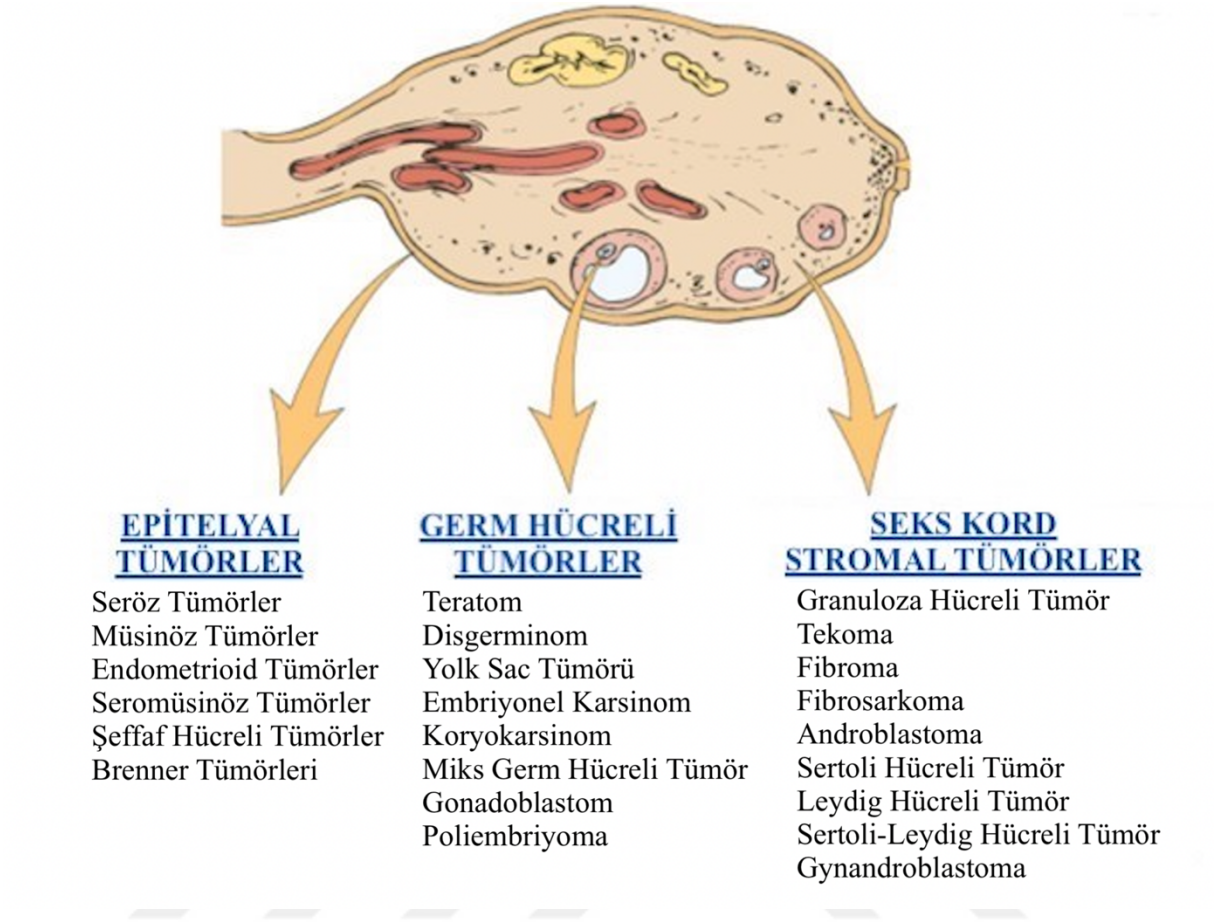
Türkiye'de 2020 yılı verilerine göre 4.059 kişiye over kanseri tanısı koyulmuştur. Tanı koyulan hastalardan 2.730 kişi hayatını kaybetmiştir. İnsidans oranı 100.000 kişi başına 7.6, ölüm oranı ise 4.9 olarak belirtilmiştir [2]. 40 yaşının altında olan kadınlarda daha nadir görülmesine rağmen 40 yaşın üzerinde görülme oranının arttığı, 60-79 yaş aralığında en yüksek oranlara çıktığı görülmüştür. Vakaların çoğunluğu malign seyreder [26].

2.2.1. Over Kanserinin Sınıflandırılması

Jinekolojik kanserlerde sınıflandırma sistemi 20. yüzyılda kadınlar arasında en yaygın görülen kanser olan serviks kanserine, daha sonra ise tüm kanser tiplerine uygulanmıştır. Sınıflandırma yetkisi 1950'lerde Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu'na (FIGO) verilmiştir [27]. FIGO, 1988 yılında yapmış olduğu evreleme ve sınıflandırma revizyonunu 2014 yılında güncelleyerek yeni bir sınıflandırma sistemine gitmiştir. Over kanserinin tek tip bir hastalık değil birbirinden farklı davranış ve morfolojiiye sahip hastalıklar topluluğu olduğunu belirtmiştir [28]. Over kanserleri, tümörün kaynaklandığı anatomik yapısına göre üç ana kategoriden oluşur. Bunlar epitelyal tümörler, seks kord stromal tümörler ve germ hücreli tümörlerdir. FIGO, epitelyal tümörlerin ortalama %90'ının malign karakterli olduğunu öne sürmüş ve epitelyal over kanserlerini immunohistokimyasal, histopatolojik ve moleküler genetik olarak 5 ana tipe ayırmıştır.

- Yüksek Dereceli Seröz Karsinom (HGSC, %70)
- Endometrioid Karsinom (EC, %10)
- Şeffaf Hücreli Karsinom (CCC, %10)
- Müsinöz Karsinom (MC, %3)
- Düşük Dereceli Seröz Karsinom (LGSC, <%5)

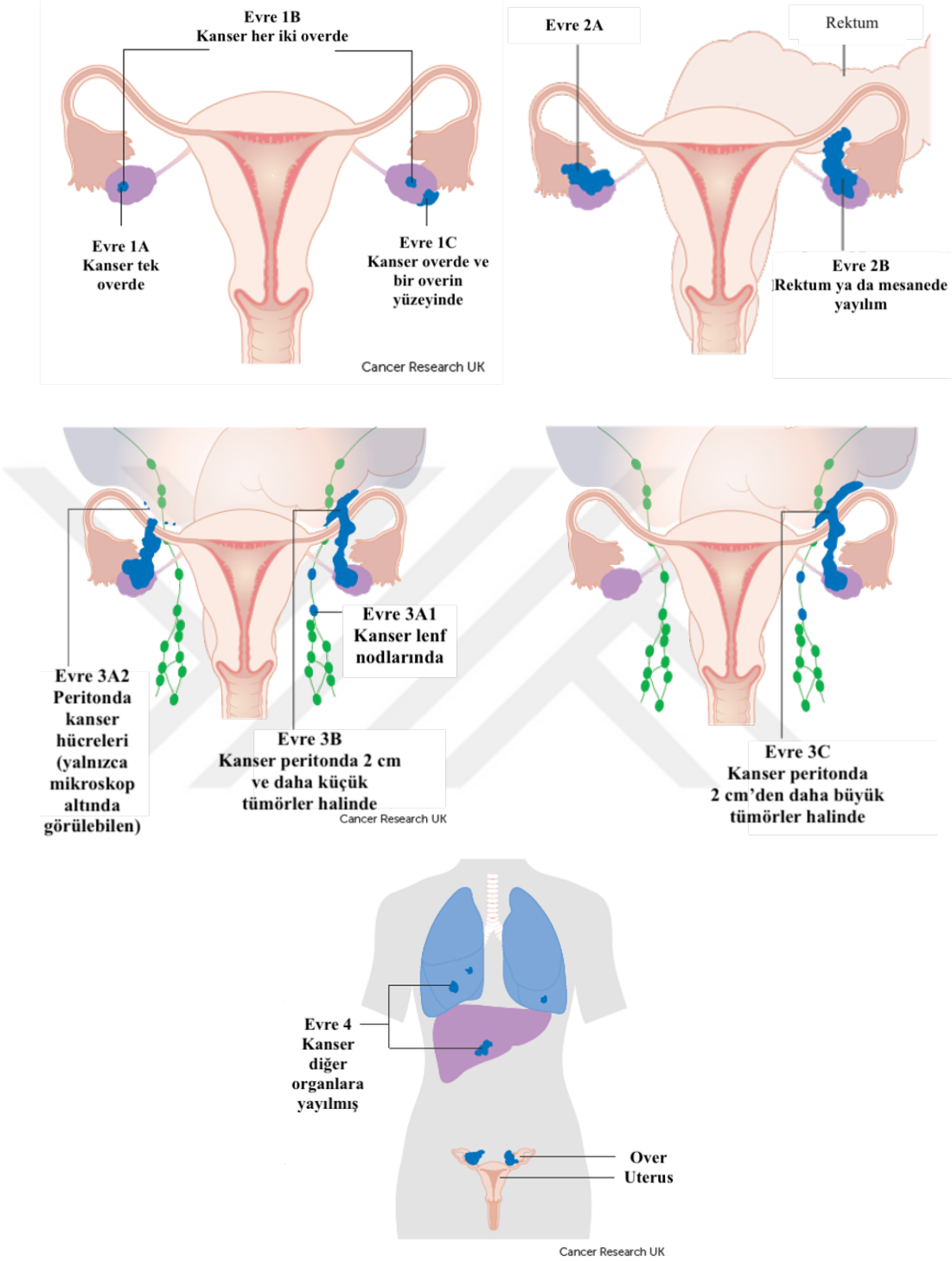
Daha az yaygın olarak malign germ hücreli tümörler (%3)(yolk kesesi tümörleri, disgerminomlar, olgunlaşmamış teratomlar) ve malign seks kord stromal tümörler (%1-2) görülmektedir [28]. Over kanserinin kökenleri ve sınıflandırılması Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Over kanserinin kökenleri ve sınıflandırılması [29].

2.2.2. Over Kanseri Evreleri

FIGO, 2014 yılında evrelemeyi over, fallop tüpü ve periton kanserini tek bir sistemi içine alacak şekilde güncellemiş ve over kanserini evre 1 ile 4 arasında sınıflandırmıştır [30]. Evre 1 over kanserinde tümör bir ya da her iki overde sınırlanmıştır. Yıkama sıvılarında da malign hücrelere rastlanmaz. İkinci evrede, tümör bir ya da overlerin her ikisinde ve overlerin dışında pelviste büyümüştür. Üçüncü evre over kanserinde, tümör bir ya da overlerin her ikisinde olmasının yanı sıra pelvisin dışında peritonun diğer kısımlarına ve/veya çevredeki lenf nodlarına yayılmıştır. Son evre olan dördüncü evrede, peritoneal metastazlar dışında tümörün uzak organlara metastaz yapmıştır [28, 30, 31]. Over kanseri evreleri Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: Over kanseri evreleri. [1]

[1] https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/ovarian-cancer/stages-grades [Ziyaret tarihi: 22 Kasım 2020].

2.2.3. Over Kanseri Tanısı

Over kanserinde spesifik bir semptom bulunmamakla beraber sıklıkla karın ağrısı veya şişkinlik şikayetleri ile hastaların semptomları oldukça çeşitlilik gösterir [32].

Pelvik kitlesi olan hastaların over kanseri risk düzeyini belirlemek için çoklu bir biyobelirteç testi olan OVA1 kullanılmaktadır. OVA1 testi; Apolipoprotein A1, transtiretin, transferrin, beta-2 mikroglobulin ve CA125 gibi beş farklı biyobelirtecin serum seviyelerini analiz eder. Kullanılan özel bir yazılım ile bireyin malignite için yüksek riskli olup olmadığı skorlara göre belirlenir. Skorun menapoz öncesinde 5'ten büyük, menapoz sonrasında ise 4.4'ten büyük olması yüksek risk ihtimalini düşündürmektedir [33].

Over kanseri tanısı için kullanılan bir diğer test ise ROMA (Risk of Malignancy Algorithm)'dır. Bu test CA125 ve HE4'ün serum konsantrasyonuna dayanan kantitatif bir testtir. Epitelyal over kanseri olan bireyleri yüksek risk grubundan, düşük risk grubuna doğru sınıflandırır. ROMA skoru, bireyin hormon ve menopoz durumuna göre farklılık gösterir [34].

Kanserden şüphelenildiği durumlarda hastalığın boyutunu tanımlamak ve metastaz olup olmadığını belirlemek için çoğunlukla bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans (MR) görüntüleme sistemleri kullanılır. Ayrıca tümörün metastaz yapıp yapmadığını ve yapılacak cerrahi işlemin kapsamını belirlemek için pozitron emisyon tomografisi (PET) tercih edilir. Atipik hastalarda görüntüleme eşliğinde yapılan kalın iğne biyopsisi tanı için kullanılan standart bir yöntemdir. Bu işlemde önemli olan örneğin doğru yerden alındığından emin olmaktır [35].

2.2.4. Over Kanserinin Risk Faktörleri

Over kanseri risk faktörlerini; üreme faktörleri, ekzojen hormonlar, jinekolojik faktörler, çevresel faktörler ve genetik faktörler başlıkları altında gruplayabiliriz [36].

2.2.4.1. Üreme Faktörleri

Gebeliğin over kanseri üzerinde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir. Terme ulaşan her gebelik ve kişinin en son gebeliğinin ileri yaşta olması over kanserinde koruyucu bir faktördür. Whiteman ve arkadaşları son doğumunu daha geç yaşlarda yapmış olan kadınların, son doğumunu erken yaşlarda yapan kadınlara göre over kanseri risklerinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir [37].

Emzirmenin meme kanseri riskini azalttığı gibi epitelyal over kanseri riskini de azalttığı düşünülmektedir. Danforth ve arkadaşları bebeğini uzun süre emziren anneleri, bebeğini hiç emzirmeyen anneler ile karşılaştırdığında over kanseri riskinde önemli bir azalma tespit etmiş ve emzirilen her ay için risk faktörünün %2 azaldığı belirtmişlerdir [38].

Epitelyal over kanseri, menarş ve menopoz yaşı arasındaki ilişki ile ilgili yapılan çalışmalarda bu faktörler arasında anlamlı bir ilişki bulunmamakla birlikte [39], Gong ve arkadaşları menarş yaşı ve over kanseri riski arasında ters orantı olduğu öne sürmektedir [40].

2.2.4.2. Jinekolojik Faktörler

Bilateral ooferektomi, over kanseri riskini büyük oranda azaltmakla birlikte rutin olarak yapılması önerilmemektedir. Bunun yanı sıra kalıtsal BRCA1, BRCA2 mutasyonlarında profilaktik ooferektomi oldukça başarılı bir işlemdir. Kadınlar menopoz evrelerine yaklaştıklarında benign amaçlı histerektomi ameliyatlarında overlerin alınması over kanseri riskini azaltmak açısından mantıklı görünse de faydalı bir etki yaratacak hormonların salınmasına devam edilmesi için genellikle overlerin hastada bırakılması tercih edilir [36].

Endometriozis, uterus içerisinde bulunan endometriumun, karın boşluğundaki başka dokulara yerleşmesine verilen addır. Kesin oluşum nedeni net olarak bilinmemektedir. Çalışmalar endometriozis ve over kanseri arasında pozitif ilişkilerin olduğunu göstermiştir [41-43]. Polikistik overli kadınların endometrial kanser riski olmakla birlikte over kanseri riskinin önemli oranda artmadığı yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir [44].

2.2.4.3. Çevresel Faktörler

Beslenme tarzının over kanseri riskinde etkili olduğu bilinmektedir. Meyve ve sebze tüketimi, A, D, C ve E vitaminleri over kanseri riskini bir miktar azaltmakla birlikte fazla miktarda tüketilen ekmek, makarna ve kırmızı etin riski arttırdığı düşünülmektedir. Bunların yanı sıra sigara kullanmak, erken yaşta alınan aşırı kilo ve obezite over kanseri riskini arttıran önemli çevresel faktörlerdendir [36].

2.2.4.4. Genetik Faktörler

Over kanseri riskini en çok etkileyen faktörler genetik olanlardır. Over kanseri insidansını %5-10 etkilediği tahmin edilmektedir. Meme kanseri ve kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanserli hastaların (Lynch sendromu), over kanseri için yüksek risk taşıdıkları düşünülmektedir [45].

BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının over kanseri riskini önemli oranda arttırdığı düşünülmektedir [46]. BRCA1, 17q kromozomu üzerinde yer alan tümör baskılayıcı bir gendir. Hücre siklusundaki önemli aşamalarda görev alır. Gende yaşanan mutasyon hücrelerde kontrol edilemeyen bir büyümeye ve tümör oluşumuna sebep olur. Over ve meme kanserli ailelerin %75'inde mutasyona uğramış BRCA1 geni görülmektedir [45].

BRCA2, 13. kromozomun q kolu üzerinde yer almaktadır. Kalıtsal meme ve over kanserli bireylerin %10-20'sinde görülmektedir. BRCA1 ile karşılaştırıldığında over kanserinde görülme riski daha azdır [45]. Nelson ve arkadaşları, BRCA1 mutasyonunun over kanseri riskini %26, BRCA2 mutasyonunun ise %10 arttırdığını öne sürmektedir [46].

Lynch sendromu, kolorektal kansere yakalanma riskini arttıran otozomal, baskın bir genetik hastalıktır. Mutasyon 2p, 2q, 3p ve 7p gibi en az dört kromozomdaki MMR genlerinde yaşanan mutasyonlardan kaynaklanır. MMR genlerinde görülen mutasyonlar over kanseri riskini %9-12 arttırmaktadır [45]. Lynch sendromu öyküsü olan ailelerden gelen kadınlar DNA onarım genlerinde mutasyonlar taşır. Bu ailelerdeki kadınların yaşam boyu over kanseri riskleri diğer kadınlara göre daha fazladır [47, 48].

Birçok kanserojenlerin ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan GSTM1 enzimindeki mutasyonların over kanseri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Baxter ve arkadaşları GSTM1 enzimini kodlayan gende meydana gelen mutasyonların endometriotik lezyonları malign ve berrak hücreli over kanserine yatkın hale getirebileceğini ifade etmişlerdir [49].

BRCA1 geni ile ilişkili olan BRIP1, Fanconi anemi J grubu proteinidir [50]. Proteine ait gende yaşanan çerçeve kayması mutasyonlarının over kanseri riskini arttırdığı belirtilmektedir [51].

2.3. OVER KANSERİ TANISINDA KULLANILAN BİYOBELİRTEÇLER

2.3.1. Protein Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri

Gen seviyelerinin, her zaman protein seviyeleri ile doğrudan bağlantılı olmaması klinikte biyobelirteç ihtiyacına sebep olmaktadır. Proteomik, bu süreçleri inceleyen bir teknolojidir. Temel amaçlarından biri, doku veya vücut sıvısı örneklerinden hastalığın tanısı için bir biyobelirteç elde etmektir.

Kanser antijeni 125 (CA125), over kanserinde sıklıkla kullanılan bir biyobelirteçtir. İleri evre over kanserlerinde değerin yükseldiği bilinmektedir. Fakat hastalığın erken evrelerinde değerinin çok yükselmemesi ve iyi huylu durumlarda ekspresyonunun artması CA125'in özgüllüğünü düşürmektedir [52]. CA125 dışında CEA ve CA19-9'da değerlendirilecek biyobelirteçler arasındadır [53].

Dieplinger ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada E vitamini bağlayıcı plazma proteini olan Afamin, over kanseri için yeni bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır [54].

Günümüzde literatürde over kanserini erkenden tanımlayacak spesifik bir biyobelirteç bulunmamakla birlikte HE4, osteopontin ve mezotelin gibi proteinler sağlıklı ve epitelyal over kanserli hastaları ayırt etmek için kullanılmaktadır [55].

2.3.2. Gen Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri

Kanserlerin, çevresel faktörler ve genetik değişiklerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Over yüzeyindeki epitel hücrelerinin malign karakter kazanması; proliferasyon, apoptoz ve yaşlanma gibi süreçlerde yaşanan genetik değişikliklere bağlanmaktadır. Genetik değişiklikler ile over kanseri arasındaki bağlantıyı aydınlatabilmek için gen düzeyindeki çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmalar potansiyel over kanseri biyobelirteçlerinin keşfedilmesini sağlayacaktır [56].

2.3.2.1. Kalıtsal Gen Mutasyonları

Over kanserlerinin yaklaşık %10'u kalıtsaldır. Over kanseri hastaların %90'ı tümör baskılayıcı genlerden olan BRCA1 ve BRCA2'de yaşanan mutasyonları taşır. Kalan %10'luk kısım ise Lynch sendromunda etkili olan hMLH1, hMSH2 gibi MMR genlerindeki mutasyonları taşıdığı ileri sürülmektedir [57]. BRCA1 ve BRCA2 mutasyonlarının yaklaşık %80'inin çerçeve

kayması şeklinde olduğu düşünülmektedir [58]. Gayther ve arkadaşlarının over kanserinin sık görüldüğü ailelerle yaptığı bir çalışmada mutasyonların BRCA2 geninin ekson 11'inde kümelendiği ileri sürülmüştür [59]. hMLH1 ve hMSH2 genleri, replikasyon sırasında yaşanan nükleotid uyumsuzluklarının onarımından sorumludur. Bu genlerde yaşanan mutasyonlar replikasyon esnasında meydana gelen hataların onarılmasını önler [57]. Genlerin mutasyonlarını belirleyebilecek genetik testler tasarlamak over kanserine yakalanma riski daha fazla olan kişileri belirlemeye yardımcı olacaktır.

2.3.2.2. Gen Anlatımı

Doku veya serumda, belirli genlerin yarı kantitatif/kantitatif olarak ölçülmesi kanser tanısına yardımcı olma potansiyeli taşımaktadır. Mikroarray teknolojisinin gelişmesine bağlı olarak gen anlatımı değişen biyobelirteçleri tespit etmek üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmaktadır. Mikroarray teknolojisi, bir doku örneğindeki binlerce genin ekspresyonunu tek bir deneyde ölçmemizi sağlar. Mikroarray teknolojisi kullanılarak over kanserinde ekspresyonu artan birkaç gen tanımlanmıştır. HE4, FOLR1, FLJ2988, Cyclin-D1 bu genlerden bazılarıdır [60].

Over kanserindeki yolakların daha iyi anlaşılabilmesi için gen ekspresyon profillerinin oluşturulmasına ihtiyaç vardır. Gen ekspresyonunun seri analizi (SAGE), hücre ve dokulardaki genlerin transkriptlerini nicel olarak ölçmeyi sağlayan tekniktir [61]. En önemli avantajı dokuda eksprese edilen genler hakkında ön bilgi sahibi olmaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Literatürde, SAGE tekniği kullanılarak sağlıklı ve kanserli over dokularının ekspresyon profillerini karşılaştıran çalışmalar yer almaktadır [60, 62, 63]. Over kanserinde anlatımı değişen genleri tespit edip evrensel bir veri bankası oluşturmak erken tanı ve tedavi için önem taşımaktadır. Apolipoprotein E (ApoE), ApoJ [62], WFDC2, CCND1, CLDN3, FOLR1, FLJ12988, COL18A1 [60], SAGE yöntemi ile tanımlanmış, over kanserinde ekspresyonu değişen genlerdir.

2.3.2.3. Epigenetik Değişimler

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisinde değişikliğe neden olmadan yalnızca gen anlatımının değişmesi ile oluşan değişikliklerdir. DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik mekanizmalar kanserin başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynar [64]. Over kanserinde CpG adası DNA metilasyonu en sık karşılaşılan epigenetik değişimlerdendir. DNA metilasyonu erken evredeki over kanserlerinde gözlenir ve kan dolaşımındaki DNA'dan tespit

edilebilir. Bu durum invaziv işlem gerektirmeyen kolay bir test ile hastalığı erken evrede tespit etme imkanı sunar [65].

Over kanserinde çok sayıda genin hipermetile edildiği ve susturulduğu düşünülmektedir. RASSF1A [66], OPCML [67], ARH1 [68], DLEC1 [69], over kanserinde hipermetile olan genlerdendir. Bunlara ek olarak over kanserinde en fazla çalışılan gen BRCA1'dir. BRCA1 promotöründe meydana gelen hipermetilasyon, BRCA1'in ekspresyonundaki kayıp ile sonuçlanır. Promotöründe gerçekleşen metilasyon sadece meme ve over kanserine spesifiktir [70].

Metilasyonların, over tümörlerinin klinik, moleküler ve patolojik özellikleri ile yakından ilgili olabileceği düşünülebilir. Metilasyon profilleri incelenerek over kanserinin düşük maligniteli ya da invaziv karakterde olduğuna dair ayrım yapılabilir. MGMT, RASSF1A, APC ve GSTP1 metilasyonları yalnızca invaziv karakterdeki over tümörlerinde görülmektedir [71].

Genler, geçirdikleri hipermetilasyon yüzdelerine göre; OPCML, CDH13, DAPK yüksek metilasyon, BRCA1, RASSF1A, WT1, CDH1, HIC1 orta metilasyon, FANCF, MLH1, RARB gibi genler düşük metilasyon olarak sınıflandırılabilir [65].

Hipometilasyon, onkogenlerin transkripsiyonel aktivasyonu ya da kromozom instabilitesi aracılığıyla tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Epitelyal over kanserlerinde hipometilasyon ile ilgili yapılan çalışmalar daha sınırlıdır [65]. LINE-1 hipometilasyonu, epitelyal over kanseri ile ilişkilendirilmiştir [72]. Woloszynska-Read ve arkadaşları, BORIS hipometilasyonu ve ekspresyonunu ileri evre over kanserleri ve düşük sağ kalım ile ilişkilendirmişlerdir [73]. Widschwendter ve arkadaşları, ileri evre seröz ve endometrioid over kanserlerinde Chr1 Sat2 ve Chr1 Satα genlerinin hipometile olduğunu göstermişlerdir [74].

2.4.MİKRORNA (MİRNA)

Ökaryotik canlılarda, genetik materyalleri ve transkriptlerini susturmak için birçok kısa RNA dizileri keşfedilmiştir. RNA dizileri, uzunluklarına ve Argonaute protein ailesi ile olan ilişkilerine göre 3 gruba ayrılırlar. Bunlar; mikroRNA (miRNA), siRNA ve piRNA'dır [75]. MikroRNA, ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'da tanımlanmıştır [7]. İlerleyen yıllarda farklı bitki ve hayvan türlerinde yeni miRNA'lar keşfedilmiştir [76]. Bu keşifler gen ifadesindeki transkripsiyon sonrası düzenleme mekanizmasına yeni bir bakış açısı kazandırmıştır. Bugüne kadar 38589 miRNA molekülü tanımlanmıştır (http://www.mirbase.org/ 29.11.2020 tarihinde erişilmiştir).

MiRNA'lar, protein üretimini baskılamak için hedefteki mRNA'ya bağlanan, tek iplikli, küçük, evrimsel açıdan korunmuş, kodlanmayan RNA'lardır [77]. Yaklaşık 22 nükleotid uzunlukları vardır. Birçok protein kodlayan genin miRNA'ların kontrolü altında olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple miRNA'ların biyosentezi ve fonksiyonlarındaki düzensizlikler çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilebilir [75].

2.4.1. MiRNA Temelli Over Kanseri Biyobelirteçleri

Eksozomal miRNA'lar, over kanserinde biyobelirteç olarak kabul edilirler. Onkogenezde yer alan miRNA'lar, anlatım profillerine ve işlevlerine bağlı olarak onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak sınıflandırılabilirler. Over kanserinde miRNA anlatım analizi için yapılan çalışmalarda bazı miRNA'ların anlatımlarının değiştiği gösterilmiştir (Tablo 2.1). MiRNA'ların hatalı anlatımlarından sorumlu olan mekanizmalar; nokta mutasyonları, kromozomal değişiklikler, epigenetik mekanizmalar, posttranskripsiyonel mekanizmalardaki genetik ve epigenetik değişiklikler olarak gruplandırılabilir [78, 79]. Over kanserinde anlatımı değişen bazı miRNA'lar Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Over Kanserinde miRNA Biyobelirteçleri.

	MİRNA	ANLATIM	REFERANS
Over Kanseri	miR-146, miR-221, miR-508	Artan anlatım	Dahiya ve Morin (2008) [80].
Over Kanseri	miR-106b, miR-422a, miR-424, miR-648, Let-7f	Azalan anlatım	Dahiya ve Morin (2008) [80].
Epitelyal Over Kanseri	miR-21, miR-141, miR-203, miR-205	Artan anlatım	Iorio ve ark. (2007) [81].
Epitelyal Over Kanseri	miR-125b1, miR-140, miR-145, miR-199a	Azalan anlatım	Iorio ve ark. (2007) [81].
Over Kanseri	miR-26a, miR-132, miR-145, let-7b	Azalan anlatım	Chung ve ark. (2013) [82].

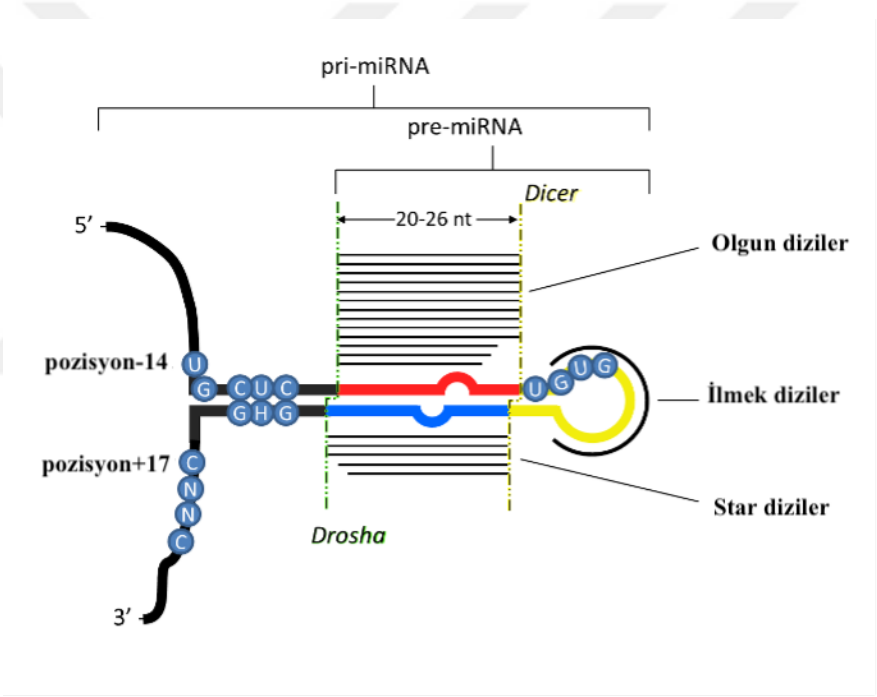
2.4.2. MiRNA Biyosentezi

MiRNA'ların biyosentezi birden çok aşamada gerçekleşir. Aşamalar; miRNA'ların transkripsiyonu, "Drosha" ve "Dicer" tarafından işlenmeleri, AGO proteinlerine yüklenmeleri ve miRNA devri olarak sıralanabilir [83]. MiRNA'ların çoğu hücrenin çekirdeğinde RNA Polimeraz II enzimi tarafından kopyalanır. Oluşan birincil miRNA'lar (pri-miRNA) 5' uçlarında 7-metil guanozin ve 3' uçlarında ise poliA kuyruğu taşırlar. Hairpin yapısındadırlar [84, 85]. Polimeraz II tarafından transkribe edilen pri-miRNA'lar protein sentezindeki transkriptlere benzer şekilde düzenlenmektedir [77].

Pri-miRNA'lar, mikroişlemci kompleks aracılığıyla pre-miRNA formuna dönüştürülür. Mikroişlemci kompleksi; RNAaz Endonükleaz III enzimi olan Drosha ve onun kofaktörü çift sarmallı RNA bağlayıcı protein DGCR8'den (DiGeorge Syndrome Critical 8 ya da Pasha olarak bilinir) oluşmaktadır [86]. "Drosha"nın, RNA'yı kestiği ve pre-miRNA'nın 3'ucuna 2 nükleotidlik bir çıkıntı bıraktığı düşünülmektedir [87]. "Drosha", bir adet çift iplikli RNA bağlanma alanı (dsRBD) içerir. Fakat substrata direkt olarak bağlanmak için iki bağlanma alanı içeren DGCR8'e ihtiyaç duyar [88]. "Drosha", 88 nükleotidlik diziyi keserek DGCR8

mRNA'sını negatif olarak düzenler [89]. "Drosha"nın pri-miRNA'yı kesmesi ile 60-70 nükletidlik pre-miRNA oluşur [86]. Olgun miRNA oluşumu Şekil 2.8'de gösterilmiştir.

Pre-miRNA'lar, olgun mikro RNA'lara dönüşmek için sitoplazmaya taşınırlar. İşlenme hücrenin sitoplazmasında gerçekleşir. Pre-miRNA, hücre nukleusundan sitoplamaya taşınmak için nukleositoplazmik taşıyıcı faktör "Exportin-5" (XPO5) ve onun kofaktörü "Ran-GTP" ile bir kompleks oluşturur [90]. GTP sitoplazmada GDP'ye hidroliz olur. Bu yıkım reaksiyonu sonucu pre-miRNA'nın sitoplazmaya salınmasına izin verilir [91]. XPO5, RNA'ların sitoplazmaya taşınması görevine ek olarak, pre-miRNA'ların ekzonükleazlar tarafından bozulmasını önler [92].



Şekil 2.5: Olgun miRNA oluşumu.[2]

[2] https://mirgenedb.org/information [Ziyaret tarihi: 5 Aralık 2020].

Çekirdekten sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar, 21-24 nükleotidlik olgun miRNA formlarına dönüşmek için RNAaz III enzimi olan "Dicer" tarafından işlenmeleri gerekir. Ribonükleaz olan "Dicer"; çift sarmallı RNA'yı (dsRNA), siRNA'ya ve pre-miRNA'yı mikroRNA'ya böler.

Sitoplazmaya geçen pre-miRNA, "Dicer" aracılığıyla işlenir ve bunun sonucunda iki nükleotid çıkıntısı olan 3′ uçlu yaklaşık 22 nükleotidlik çift iplikli RNA (dsRNA) elde edilir. Çift iplikli RNA, miRNA ile indüklenmiş susturma kompleksi ("miRISC") oluşturan "Argonatue" proteinlerine yüklenir ve çift iplikli RNA'nın bir ipliği olgun miRNA olarak kalırken, diğer ipliği "Argonatue" proteinleri tarafından çıkarılmaktadır [93, 94]. İnsanda mRNA'nın bölünmesini kataliz eden "Argonaute" proteini Ago2'dir. RISC kompleksi Ago2, PACT, TRBP ve "Dicer"dan oluşur [95]. Tek iplikli miRNA, RISC kompleksi tarafından tutulur. RISC kompleksi, mRNA'daki komplementer diziye bağlanması için miRNA'yı o bölgeye taşır. MiRNA, mRNA ile birleşir ve mRNA'yı keserek degrade eder ya da translasyonunu inhibe eder [75].

2.4.3. MiRNA Veritabanları

MikroRNA dizileri için en bilinen çevrimiçi kaynaklardan biri miRBase'dir (http://www.mirbase.org/). 2002 yılında kurulmuştur. MiRNA'ların isimlendirilmesinden sorumlu olan bu web site, yeni keşfedilen miRNA'lara gen adı vermektedir. Web site, bu zamana kadar yayınlanmış miRNA'ların dizimlerini, literatür bilgilerini, öncüllerini, genom koordinatlarını ve bunun gibi birçok bilgiye ulaşmamızı sağlar. Ayrıca miRNA'ların öngörülen ve deneysel olarak doğrulanmış hedeflerine ulaşmanızı sağlayan kaynaklara yönlendirir [96].

MiRBase dışında kullanılan çok sayıda farklı veritabanları mevcuttur. Bu web sitelerinden bazıları Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Veri tabanları sadece Homo sapiens'i içerebileceği gibi bitkiler, hayvanlar ve bazı türlere ait miRNA'ları da içerebilir.

Tablo 2.2: MiRNA web siteleri.

VERİTABANI	İNTERNET ERİŞİM ADRESİ
MİRBASE	http://www.mirbase.org
MİRDB	http://mirdb.org/miRDB/
MİRWALK	http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/
STARBASE	http://starbase.sysu.edu.cn/
TARBASE	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/

2.4.4. MiRNA'lar Tarafından Gen Anlatımının Düzenlenmesi

Tez kapsamında, hsa-miR-200c-3p'nin hedeflediği genlerden biri olan ZEB1'in gen anlatım analizi yapılmıştır. EMT aktivasyonu ile ilişkili olan TGF-β yolu, ZEB1'in ekspresyonunu indükler. Artan ZEB1 ekspresyonu, hücre polaritesi ve hücre-hücre adhezyonunu azaltır. Bu durum hücre hareketliliğini ve metastazı sağlar. ZEB1 bu süreci, bazal membran bileşenleri, hücre polarite faktörleri, epitel hücre fonksiyonları ve bazı proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak gerçekleştirir [97]. Ayrıca ZEB1'in epitelyal farklılaşmayı indükleyerek EMT'yi baskılayan hsa-miR-200c-3p gibi miR-200 ailesi üyelerinin transkripsiyonlarını baskıladığı gösterilmiştir [20]. Negatif geri bildirim mekanizmasında hsa-miR-200c-3p, ZEB1'in ekspresyonunu inhibe eder. ZEB1 ve hsa-miR-200c-3p arasındaki bu denge EMT'yi ve metastatik özelliklere sahip kanser hücrelerinin daha ileri seviyeye geçmesini engeller [97].

2.5. EPİTELYAL MEZENKİMAL TRANSİZYON (EMT)

İnsan vücudu dört ana doku olan epitel, bağ, kas ve sinir dokularından meydana gelir. Epitel dokular, sıkı ve düzenli şekilde bir araya gelen hücreler ve bu hücrelere göre miktarı daha az olan hücreler arası maddelerden oluşmaktadır. Hücrelerin birbirleri ile olan bağlantıları oldukça güçlüdür. Vücudun iç ve dış yüzeyini örtmekle görevli olan epitel hücreleri bu özellikleri sayesinde vücuda yabancı madde giriş çıkışını engelleyen bir savunma mekanizması olarak işlev görürler. Epitel hücreleri, kendilerini bağ dokudan ayıran bazal lamina olarak adlandırılan ince bir zar üzerine düzenli şekilde yerleşmişlerdir [98].

Epitel hücreleri birbirlerine oldukça sıkı bir şekilde yapışmışlardır. Hücreler arası yapışma özellikleri deri gibi basınca daha çok maruz kalan epitel doku çeşitlerinde net olarak görülür. Yapışma, çoğunlukla "kadherin" ismiyle bilinen transmembran protein ailesinden kaynaklanmaktadır [98].

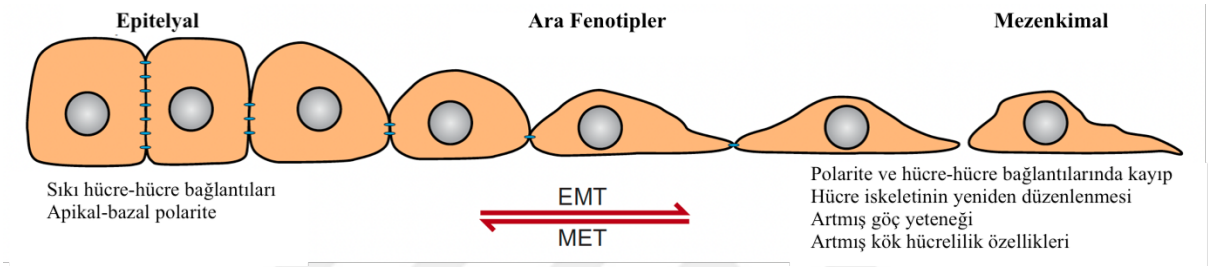
Epitel hücrelerinin birbirleri ile bağlantı kurmasını sağlayan çeşitli bağlantı tipleri vardır. Bu bağlantı tiplerinden biri zonula adherens'tir. Zonula adherens bir hücreyi tamamen sararak sahip olduğu hücrenin komşu hücrelere yapışmasını sağlamaktadır. Zonula adherens'te bağlantının olduğu kısmın sitoplazmaya bakan tarafında çok miktarda aktin filamanları yer almaktadır [98].

Desmozomlar bir diğer bağlantı çeşididir. Hücrenin yüzeyinde yer alan disk şeklinde bir yapıdır. Komşu hücrede de bulundukları zaman hücreler arasında bağlantı kurmuş olurlar. Hücreler arasında oldukça dayanıklı bağlantılar meydana getirirler. Desmozomun oluşturduğu bağlantılara kadherin ailesinden proteinler de katılır. Kalsiyumun, bağlantıların oluşmasında önemli olduğu düşünülmektedir. Ortamdaki kalsiyum azaldığında hücreler arası bağlantılar da bozulmaya başlar [98].

Mezenkimal hücreler, embriyonel gelişimdeki mezoderm tabakasının farklılaşmasıyla ortaya çıkan bağ dokusuna ait ilk hücrelerdir. Yıldız şeklindedirler. Dağınık kromatin yapıları ve belirgin nukleolus yapıları ile ayırt edilirler. Çok sayıda ince sitoplazmik uzantılara ve kuvvetli bölünme yeteneğine sahiptirler. Erişkin bireylerde mezenkimal hücreler daha çok damarların çevresi ve gevşek bağ dokuda yer alır [98]. **Epitelyal Mezenkimal Transizyon (EMT)**, epitel hücrelerin gelişmiş oranda göç yeteneğine sahip olan mezenkimal hücrelere dönüştüğü biyolojik bir süreçtir (Şekil 2.9). EMT'de hücreler çok sayıda biyokimyasal değişikliklere

uğrarlar. Ekstraselüler matriks bileşenlerinde önemli oranda artış, invazivlik ve apoptoza karşı dirençli olma gibi yetenekler kazanırlar [99].

EMT'nin başlaması ve sonlanmasında bir dizi moleküler mekanizma devreye girer. Hücre iskeletini oluşturan proteinlerin ekspresyonu ve yeniden düzenlenmesi, miRNA'ların ekspresyonundaki değişiklikler, transkripsiyon faktörlerinin aktif hale gelmesi ve hücre yüzeyine özgü proteinlerin ekspresyonu bu mekanizmalar arasındadır [100]. EMT'de yaşanan moleküler ve biyokimyasal değişiklikler, biyobelirteç belirleme çalışmaları için önemli hedefler olabilirler.



Şekil 2.6: Epitelyal mezenkimal transizyonun gösterimi [101].

2.5.1. EMT'nin Sınıflandırılması

EMT, implantasyon, embriyogenez ve organ gelişiminde, doku rejenerasyonu ve organ fibrozunda, kanser ilerlemesi ve metastazda olmak üzere üç sınıfa ayrılır [6, 100].

2.5.1.1. İmplantasyon, Embriyogenez ve Organ Gelişiminde EMT

EMT, gelişimde olumlu bir süreç olarak tanımlanır. İmplantasyon, embriyogenez ve organ gelişiminde önemli rol oynar. Embriyogenezdeki EMT, Tip 1 olarak tanımlanır [102]. Embriyogenezde, yumurta döllendikten sonra gastrulasyona uğrar ve üç germ tabakası oluşur. Epitel hücreleri, ilk evrede tek tabaka halindedir. İlerleyen evrelerde e-kadherin eksprese eder ve hücrelerde apikal-bazal polarite oluşmaya başlar. Primitif çizgi oluşumu gastrulasyonun işareti olarak görülür. Primitif çizgi daha sonraki süreçte ektoderm ve mezodermi oluşturmak için EMT geçirir.

Gastrulasyon ile ilişkili olan EMT biyokimyasal olarak incelendiğinde Wnt sinyalinin etkili olduğu görülmüştür. Liu ve arkadaşları, Wnt3 sinyali eksik olan embriyoların, gastrulasyondaki EMT sürecini tamamlayamadıklarını göstermişlerdir [103]. Embriyogenezdeki bir başka EMT

örneği, nöral krest oluşumudur. Nöral krest hücreleri Slug, Sox ve Snail genlerini eksprese ederek EMT'ye sebep olurlar. Gerçekleştirdikleri EMT sayesinde hücreler, hareketli hale geçer ve embriyonun faklı bölgelerine giderler. Buralarda daha farklı hücre tiplerine farklılaşırlar [104].

2.5.1.2. Doku Rejenerasyonu ve Organ Fibrozunda EMT

Fibrozis, hücreler arasında bağ doku birikmesidir. Bir travma veya enflamasyon sonrası yaralanan bölgenin iyileşmesi için fibroblast, elastin, kollajen ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin üretimi başlar. Travma bölgesinde skar dokusu oluşur. Bu süreçte Tip 2 EMT'nin görev aldığı düşünülmektedir [105, 106]. EMT'nin akciğer, böbrek, karaciğer ve kalbin fibrotik hastalıklarında da rol aldığı ifade edilmektedir [107].

Inoue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, böbrek fibrozunda EMT'nin etkili olduğunu göstermiştir [108]. Jayachandran ve arkadaşlarının yaptığı farklı bir çalışmada, EMT'de transkripsiyon faktörü olan Snail'in akciğer fibrozunun gelişmesinde rol aldığı gösterilmiştir [109].

2.5.1.3. Kanser İlerlemesi ve Metastazda EMT

Erken evre tümörlerindeki epitel hücreler, tümörün ilerlemesi devam ettikçe daha çok mezenkimal özellikler kazanmaktadır. Tip 3 EMT olarak bilinir. E-kadherin gibi epitel hücre adhezyon moleküllerinin kaybı ve β-kathenin gibi mezenkimal belirteçlerin aşırı ekspresyonu ile karakterizedir. Tip 3 EMT, fibroblast oluşumunda etkili olan bir mekanizma değildir. Daha çok invazyon ve metastaz için tümöral epitelyal hücreleri hazırlayarak transizyon için bu mekanizmayı kullanır [110]. EMT, tümörün ilerlemesi sırasında meydana gelirse, iyi huylu tümör hücrelerini çevreleyen dokuya infiltre olma ve uzak bölgelere metastaz yapma yeteneği kazanır [107].

Tip 3 EMT'nin onkogenezdeki rolü ile ilişkili en önemli belirti, EMT düzenleyicilerinin tümör oluşumunda veya metastazı arttırmadaki yeteneğidir. Fan ve arkadaşları, transkripsiyon faktörü olan Snail'in insan kolorektal kanserinde ekspresyonunun arttığı ve bu durumun eş zamanlı olarak kemoterapik direnci arttırdığını göstermiştir [111].

EMT'nin bir başka belirteci β-kathenin'in aşırı ekspresyonudur. Nükleer β-kathenin, kolorektal kanserde kötü prognoz ile ilişkilidir. Tümör ve o tümöre ait metastazın gerçekleşeceği doku

arasında EMT belirteçlerinin tespit edilmesi, epitelyal mezenkimal transizyonun tümör gelişimi sırasında gerçekleştiğinin ve tümör agresifliğini düzenlediğinin önemli bir kanıtıdır [107].

Metastaz sonucu oluşan tümörlerin, primer tümöre histolojik olarak benzer olması kitlenin EMT aracılığıyla meydana geldiğinin göstergesidir. Oluşan metastatik tümörün kolonize olabilmesi için EMT'yi ters yönde gerçekleştirmesi gerektiği (mezenkimal epitelyal transziyon, MET) düşünülmektedir. Bu durumda nükleer β-kathenin'in yerini sitoplazmik β-kathenin'in aldığı ve e-kadherin'in eksprese olmaya başladığı gösterilmiştir [112].

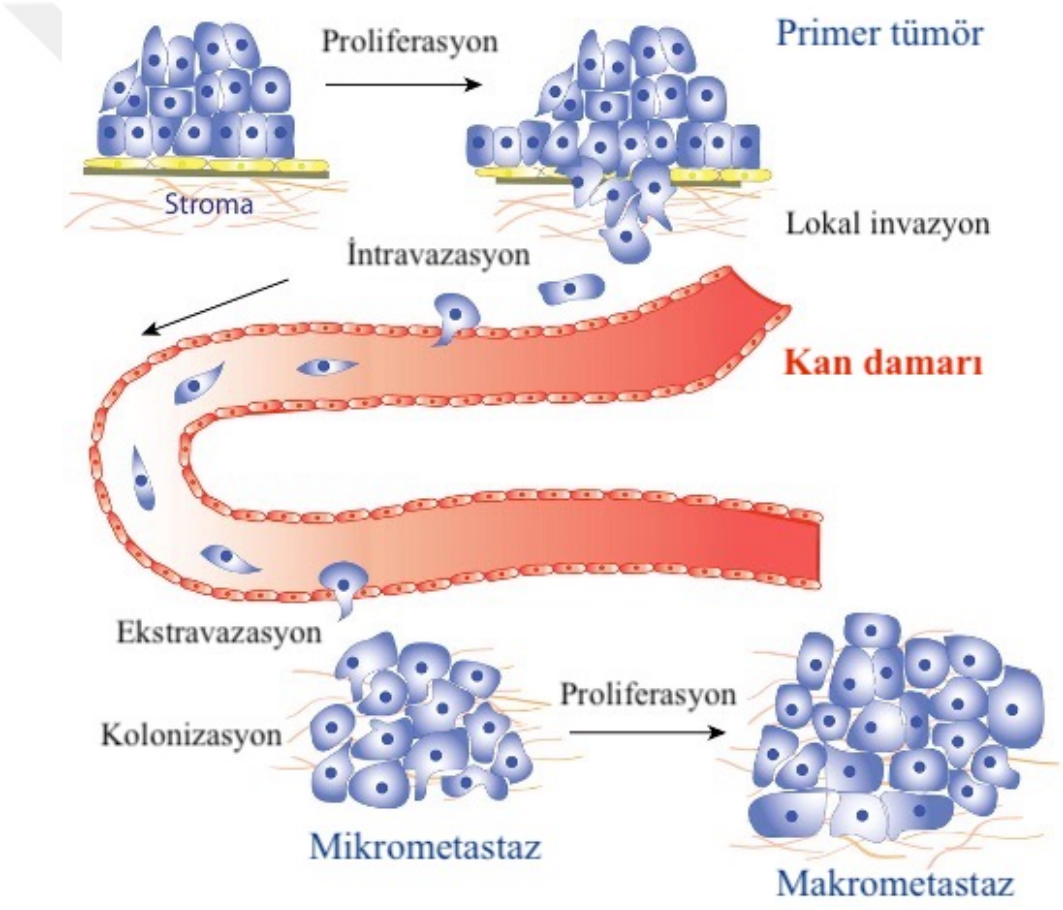
2.5.2. Metastaz Kaskadı

Metastaz, kanser tedavilerinde en önemli sınırlayıcı faktör ve ölüm oranlarını arttıran tümör gelişim sürecidir. Metastazın işleyiş mekanizmasını çözümlemek kanser tedavilerinde büyük başarı yakalanmasını sağlayabilir. Metastazın oluşumu birden fazla aşamayla gerçekleşir. Metastaz aşamaları; lokal invazyon (epitelyal mezenkimal transizyon), intravazasyon, dolaşımda sağkalım, ekstravazasyon, mikrometastaz ve metastatik koloni oluşumudur.

Lokal invazyon aşamasında, tümör hücreleri bazal membranı geçerek bağ dokusuna ulaşırlar. Burada farklılaşmış hücreler, farklılaşmamış hücrelere dönüşerek ana kitleden ayrılmak için çeşitli mekanizmalar geliştirirler. En önemli mekanizma; hücreler arası adhezyonu sağlayan e-kadherin proteinin, transkripsiyon faktörleri olan Twist, Snail, ZEB1 ve ZEB2 tarafından ekspresyonunun baskılanmasıdır. Süreç sonunda epitel tabaka daha geçirgen özellik kazanır [113]. EMT süreci gerçekleşirken e-kadherin ekspresyonu azalmasına karşın n-kadherin ekspresyonu artar. Artış, kanserli hücrelerin ana dokudan ayrılarak daha invaziv karakter kazanmasını sağlar. Kadherinlerde meydana gelen ekspresyon değişimleri "**Kadherin değişimi**" olarak adlandırılır. Bu durum kanserin kötü prognozlu olması ve invazivliği ile ilişkilidir [114].

İntravazasyon, tümör hücrelerinin kan ve lenf damarlarına geçmesi anlamına gelir [113]. Süreci destekleyenler; transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)'dür. VEGF, anjiyogenez oluşumunda görev alır. Yeni damarlar oluşarak tümör hücrelerinin daha fazla beslenmesi ve büyümesini sağlarlar. Genel olarak tümör hücrelerinin büyük çoğunluğu dolaşımda immün sistem tarafından ortadan kaldırılır. Az bir kısmı ise immun sistemden kaçıp hayatta kalarak metastaza sebebiyet verebilir.

Ekstravazasyon, dolaşımda bulunan tümör hücrelerinin damar duvarını aşıp organlara ulaşmasına verilen addır [115]. Süreç, MMP-1 ve MMP-2 faktörleri aracılığıyla başlar. Mikro oluşum için tümör hücrelerinin başka bir organın parakimine yerleşip burada hayatta kalabilmesi gerekir. Tümör dokusunun yakın çevresinde tümörün yaşamını devam ettirebilmesi için bir dizi değişiklikler meydana gelir. İlerleyen süreçte EMT ters bir işleyişe geçerek **Mezenkimal Epitelyal Transizyon (MET)** gerçekleştirir. Tümör hücreleri ilgili organda çoğalarak makro koloniler oluşturur. Her mikro koloni, makro koloni haline geçemeyebilir. Bazı durumlarda bulunduğu bölgede yıllarca sessiz kalabilirler [113, 116]. Metastaz kaskadı, Şekil 2.10'da şematize edilmiştir.



Şekil 2.7: Metastaz kaskadı.[3]

[3] https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.molonc.2013.02.009 [Ziyaret tarihi: 26 Aralık 2020].

2.5.3. Polarite ve EMT

Bazal membran ile temas halinde olan epitel hücreleri çeşitli moleküllerin etkileşimi aracılığıyla apikal-bazal polariteye sahip olurlar. EMT sırasında epitel hücreleri arasındaki bağlantıların çözülmesi apikal-bazal polaritenin kaybına sebep olur [117]. Süreç moleküler olarak incelendiğinde, tümör hücrelerindeki e-kadherin ekspresyonun azalması, apikal polarizasyonda görev alan "Scribble" (SCRIB) kompleksinin lateral plazma membranı ile iletişime geçememesine neden olur. Bu durum hücreler arası yapışmayı azaltarak hücrelerin daha hareketli olmalarını sağlar [118].

2.5.4. EMT'de Sinyal Yolakları

EMT'yi düzenleyen birçok sinyal yolağı vardır. Bunlardan bazıları "Transforming Growth Factor-β" (TGF-β) süper ailesinin farklı üyelerini içeren Wnts, Notch, EGF, HGF, FGF, HIF'dir. Sinyal yolaklarının ortak noktası e-kadherin baskılayıcılarının indüksiyonunda bir araya gelmeleridir [6].

2.5.4.1. TGF-β Sinyal Yolağı

TGF-β; epitelyal hücre proliferasyonunun önemli bir baskılayıcısı, tümör ilerlemesi ve metastazın pozitif düzenleyicisi olarak görev alır [100]. Song, TGF-β'nın bazı kanser çeşitlerinde EMT'yi indükleyebileceğini göstermiştir [119].

TGF-β sinyal yolağı, EMT'yi indüklediği bilinen en iyi tanımlanmış yolaktır. Sinyalleşme, üç TGF-β izoformu (TGF-β1, TGF-β2 ve TGF-β3) ve altı BMP izoformu (BMP2'den BMP7'ye) içeren ligandların TGF-β süper ailesi tarafından aktive edilmesiyle gerçekleşir. TGF-β1, kanser ve fibroz aracılı EMT'de etkilidir. [120]. TGF-β sinyal yolağı, tip I ve tip II TGF reseptörlerinden (TGF-βRI ve TGF-βRII) oluşan heterotetramerik reseptör kompleksinin oluşumuyla gerçekleşir. Memelilerde 7 tip reseptör I ve 5 tip reseptör II tanımlanmıştır. Ligandların bağlanmasıyla TGF-βRII, TGF-βRI'i transfosforile eder ve kinaz aktivitesini kolaylaştırır. [121, 122]. Farklı reseptörlerin oluşturduğu kombinasyonlar, aynı ligand aracılığıyla aktive edildiğinde farklı sinyalleşmelerin ortaya çıkmasını sağlar [122]. BMP sinyalizasyonu TGF'ye benzer şekilde meydana gelir. Farklı olarak, bu sinyallemede TGF-βRII yerine tip II BMP reseptörü yer almaktadır [123].

TGF-β ile indüklenen EMT'de iki sinyal yolu tanımlanmıştır. İlki Smad proteinlerini içerir [124]. Smad proteinleri, TGF-β süper ailesinin alt gruplarıdır. Amino ve karboksi terminal bölgelerinde MH1 ve MH2 olarak bilinen iki korunmuş alanları vardır. Reseptör smadlar (R-Smad), ortak smadlar (Co-Smad) ve engelleyici smadlar (I-Smad) olarak üç sınıfa ayrılırlar. Her birinin farklı işlevleri vardır.

Sinyal yolağı, R-Smad'ların fosforile edilmesiyle başlar. TGF-β ve aktivitin tip I reseptörleri Smad 2'yi aktive eder. ALK1, Smad 3 ve BMP tip I reseptörleri ise ALK3, ALK6, ALK2, Smad 1, Smad 5 ve Smad 8'i hedef alır. R-Smad'lar fosforillendikten sonra Smad 4'e bağlanarak nükleusa geçerler. Nükleus içerisinde transkripsiyonu düzenleyerek, DNA'yı bağlayabilirler. Smad sinyal yoluyla gerçekleşen süreçler, transkripsiyonel tanımlamada önemli bir rol oynar fakat burada nükleusa giren smad proteini miktarı önemli bir belirleyici faktördür [125].

2.5.4.2. Wnt Sinyal Yolağı

Wnt sinyal yolağı embriyonik gelişimde hücrenin hareketliliğini, farklılaşmasını ve büyümesini düzenleyen, salgılanan faktörlerdir. Hücre içerisinde çeşitli sinyalleme kaskadlarını aktive ederler. Wnt sinyal yolunun tümör oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir [126]. Yolağı hedef alan terapotik ilaçlar keşfedilerek kanser tedavisi için önemli gelişmeler elde edilebilir.

"*Int-1*", Wnt ailesinin ilk üyesidir. Protoonkogen olarak farede keşfedilmiştir. Int-1 geni ile büyük oranda benzerlik gösteren bir gen Drosophila'da bulunmuştur. "Wingless" olarak adlandırılan gen, Int-1'in homoloğu olarak kabul edilmiştir. Wnt geni adını; wingless ve Int-1 genlerinin adlarının birleştirilmesinden almıştır [127]. Sinyal yolağı; Parkinson, Alzheimer, kanser gibi bir takım hastalıklarla ilişkilendirilmiştir [128].

Wnt sinyali 3 farklı yolaktan oluşmaktadır;

1. β-kathenin stabilizasyonu ile hedef genlerin etkinleştirildiği bu yol "kanonik" olarak adlandırılır. Klasik yol olarak da bilinir. Hücre içi sinyalizasyon, Wnt ligandının, "Frizzled" (Fz) reseptörüne ve onun ko-reseptörü olan LRP5/6 proteinine bağlanmasıyla başlar. Sinyalizasyonun başlayabilmesi için gerekli olan yapı (Wnt-Fz-LRP5/6) oluşturulmuş olur [129, 130]. Üçlü yapı, DVL fosforilasyonunun uyarılması için sitoplazmaya geçer. Sitoplazmada yıkım kompleksini parçalayarak β-kathenin'in stabilize olmasına ve nükleusa

geçmesine izin verir. Nukleusa gelen β-kathenin, TCF/LEF adı ile bilinen transkripsiyon faktörü ailesinin üyelerine bağlanır ve Wnt hedef geninin transkripsiyonunu sağlar [131, 132].

2. Hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini kontrol eden yoldur. Planar hücre polarite yolu olarak adlandırılır. Kanonik olmayan Wnt yolağıdır. Bu yolakta Wnt ligandları, Fz reseptörlerine bağlandığında RhoA, Cdc42, RAC gibi GTPazlar aktive edilmiş olur. Hücrelerin kutuplaşmasını düzenlerler [126, 133].

3. Wnt/Ca^{2+} yolu kanonik olmayan bir yolaktır. Wnt 5 ve Wnt 11 tarafından uyarılır. Hücre içerisindeki Ca^{2+} seviyesinde artış meydana getirir. Fosfataz kalsinörin, kalmodulin bağımlı kinaz, transkripsiyon faktörü NF-AT gibi Ca^{2+}'ye duyarlı olan bileşenleri aktif hale getirir [126, 134].

2.5.4.3. Notch Sinyal Yolağı

Notch sinyal yolağı; hücrelerin sağ kalımı ve organogenezde rol oynayan, gelişimde görev alan sinyal yolaklarından biridir [135]. Notch, ligandlar aracılığıyla komşu hücrelerle iletişim kurarak, hücre farklılaşmasında görev alan bir proteindir. İlk olarak 1914 yılında *Drosophila melanogaster*'de karakterize edilmiş ve bu terim sineklerin kanatlarının ucundaki çentikli görünümü belirtmek için kullanılmıştır [136]. Memelilerde Notch 1, Notch 2, Notch 3 ve Notch 4 olmak üzere 4 farklı Notch reseptörü tanımlanmıştır. Ek olarak Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, Jagget 1, Jagget 2 olarak 5 farklı ligand tespit edilmiştir. Hücrelerin birbirleri ile olan etkileşimlerinde bir hücrede Notch reseptörü diğer hücrede Notch ligandı bulunur. Notch reseptörlerinin hücre içerisindeki kısımlarına Notch hücre içi bölge (Notch Intracellular Domain: NICD) adı verilir [137].

Sinyal yolağında, notch reseptörleri ligandlar ile etkileşime girer. Bu etkileşim reseptörlerin protelitik yıkılmasına neden olur. Yıkım sonucunda notch hücre içi bölge açığa çıkar ve nukleusa geçer. NCID, transkripsiyon kompleksi oluşturmak için DNA bağlayıcı bir protein ile birleşir. Oluşan kompleks ile hedeflenen genlerin transkripsiyonu başlar [138]. Vorontchikhina ve arkadaşlarının memeli over dokuları ile yaptığı bir çalışmada, Notch sinyal yolağı üyelerinin folikülogeneziste oldukça etkili olduğu gösterilmiştir [139].

2.5.5. EMT'yi Oluşturan Transkripsiyon Faktörleri

TGF-β, Wnt, Notch gibi sinyal yolakları, epitelyal karakterin koruyucusu olan e-kadherin ekspresyonunu azaltmaktadır. Azalan e-kadherin ekspresyonu, EMT'de tümör hücrelerinin invazivlik kazanmasına sebep olmaktadır [6]. E-kadherinin baskılanmasına, CDH1 gen promotörünü hedefleyen transkripsiyonel baskılayıcılar aracılık eder. Bu transkripsiyon faktörlerinin en bilinenleri Snail ailesinden Snail1 ve Snail2 (Snail ve Slug olarak bilinir), ZEB ailesinden ZEB1 ve ZEB2, bHLH proteinlerinden Twist1 ve Twist2'dir [140, 141]. Bunların dışında E47, KLF8, Goosecoid, FOXC2, FoxQ1 gibi transkripsiyon faktörlerinin de EMT'de yer aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [142-145].

2.5.5.1. Snail Transkripsiyon Faktörleri

Snail ailesinin ilk üyesi olarak bilinen Snail, *Drosophila Melanogaster'*de gösterilmiştir [146]. Mezoderm oluşumunda gerekli olduğu bilinmektedir. Günümüzde, insanlarda ve diğer omurgalılarda Snail homologları tanımlanmıştır [147]. Snail ailesi üyeleri çinko parmak tipte transkripsiyon faktörleri kodlar. Üyelerin hepsi benzer organizasyonda düzenlenmişlerdir. Dört ile altı çinko parmak içeren, yüksek oranda korunmuş bir karboksi-terminal bölge ve amino-terminal bölgeden oluşmaktadırlar. Parmaklar, amino-terminal kısmı DNA'nın büyük oluğuna bağlanan α-sarmalı ve iki β-iplikten oluşur. Snail genlerinin altı bazlık bağlanma merkezleri vardır (CAGGTG). Bağlanma merkezlerindeki dizilim "Basic-Helix-Loop-Helix" (bHLH) transkripsiyon faktörlerindeki bağlanma merkezi olan "E-box" ile aynıdır. Bu durum snail proteinlerinin aynı bağlanma dizileri için bHLH transkripsiyon faktörleriyle rekabet edebileceğini göstermektedir [148]. Snail süper ailesi iki alt aileye ayrılmaktadır. Bunlar Snail1 (Snail) ve Snail2 (Slug)'dir [147].

Snail'in memelilerde e-kadherin aracılığı ile EMT'yi tetiklediği bilinmektedir. E-kadherini doğrudan baskılayarak normal epitel hücrelerini mezenkimale dönüştürür. EMT, gastrulasyonda mezodermal girintinin oluşması için gereklidir. Fare embriyoları ile yapılan bir çalışmada Snail mutantlı embriyoların e-kadherin ekspresyonunu koruduğu gösterilmiştir. Bu sonuç Snail'in e-kadherin ekspresyonunun baskılanmasında önemli olduğunu açıklamaktadır [149].

E-kadherin, Snail'in doğrudan hedefi olarak bilinir. E-kadherine ek olarak bazı aday hedefler tanımlanmıştır. Bunlardan epitelyal belirteç olan "desmoplakin", "cytokeratin-18" ve "Muc-

1"in ekspresyonları azalırken, mezenkimal belirteç olan "vimentin" ve "fibronektin"in ekspresyonları artar [149]. EMT süreçleri epitelyal tümörlerin invazivlik kazanmasında etkilidir. TGF-β, epitel hücrelerinde Snail ifadesini ve EMT'yi indükler [150].

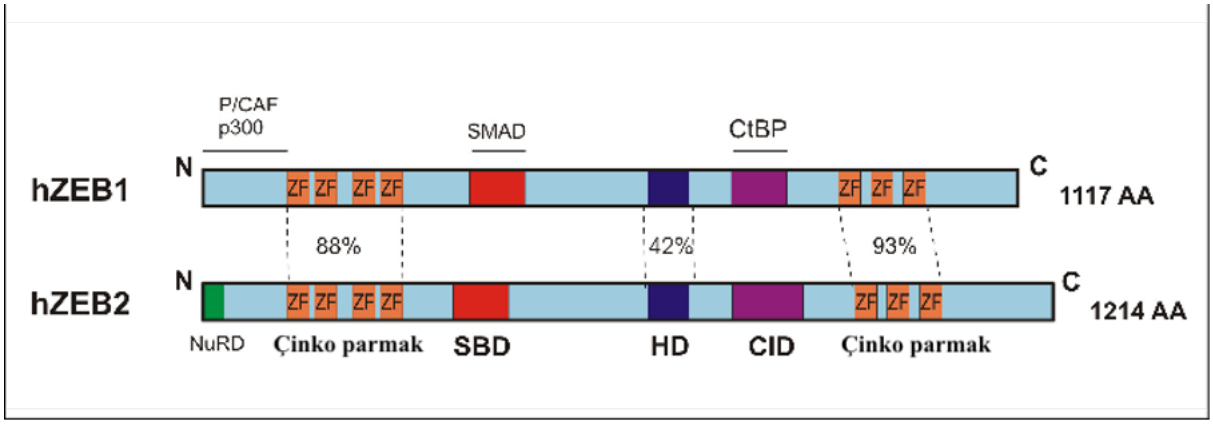
2.5.5.2. Bhlh Transkripsiyon Faktörleri

Homodimerik ve heterodimerik bHLH (basic helix-loop-helix) transkripsiyon faktörlerinin, hücre tipini belirleme ve hücrelerin farklılaşmasını kontrol etmede önemli rol oynadığı gösterilmiştir [151]. Omurgalılarda Twist1 ve Twist2 olmak üzere 2 çeşit Twist geni bulunmaktadır. Mezodermden kökenlenen dokuların gelişiminde rol oynarlar [152].

Promoterlerin proksimal bölgesinde E-box olarak adlandırılan CANNTG dizisini tanırlar. E-box'lara Twist bağlanması, e-kadherin ekspresyonunu transkripsiyonel olarak baskılar ve hücreler arası adhezyon bozulur. Hücreler arası bağlantı mekanizmalarının bozulması primer tümörden tek bir kanser hücresinin yayılmasını indüklerler [153]. Twist'in aşırı ekspresyonu hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine ve EMT'yi indüklemek için TGF-β2 ve Akt2 gibi temel sinyal moleküllerinin anlatımının artmasına neden olur [154].

2.5.5.3. ZEB Transkripsiyon Faktörleri

ZEB transkripsiyon faktörü ailesi, ZEB1 (TCF8, δEF1, Zfhx1a ve AREB6 olarak da bilinir) ve ZEB2'den (Zfhx1b ve SIPI olarak da bilinir) oluşur. ZEB1 ve ZEB2, bir homeodomain tarafından bölünmüş iki çinko parmak alanı içeren büyük transkripsiyon faktörleridir. Molekül ağırlıkları 124 ve 136 kDa'dur. Çinko parmak yapıları yüksek oranda korunmuştur (Şekil 2.11). E-kadherin gibi hedef genlerin promotörlerinde bulunan E-box (CANNTG) dizilerine bağlanırlar. ZEB ailesinin üyeleri, Smads, BRG1, p300 / pCAF, NuRD kompleksi ve CtBP gibi çok sayıda transkripsiyon faktörü ve kofaktörü ile etkileşime girerler. Etkileşimler, ZEB1 ve ZEB2'nin transkripsiyon baskılayıcısı yada aktivatörü olacağını belirler [155].



Şekil 2.8: ZEB ailesine ait transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonel alanlarını gösteren şematik diyagram [139].

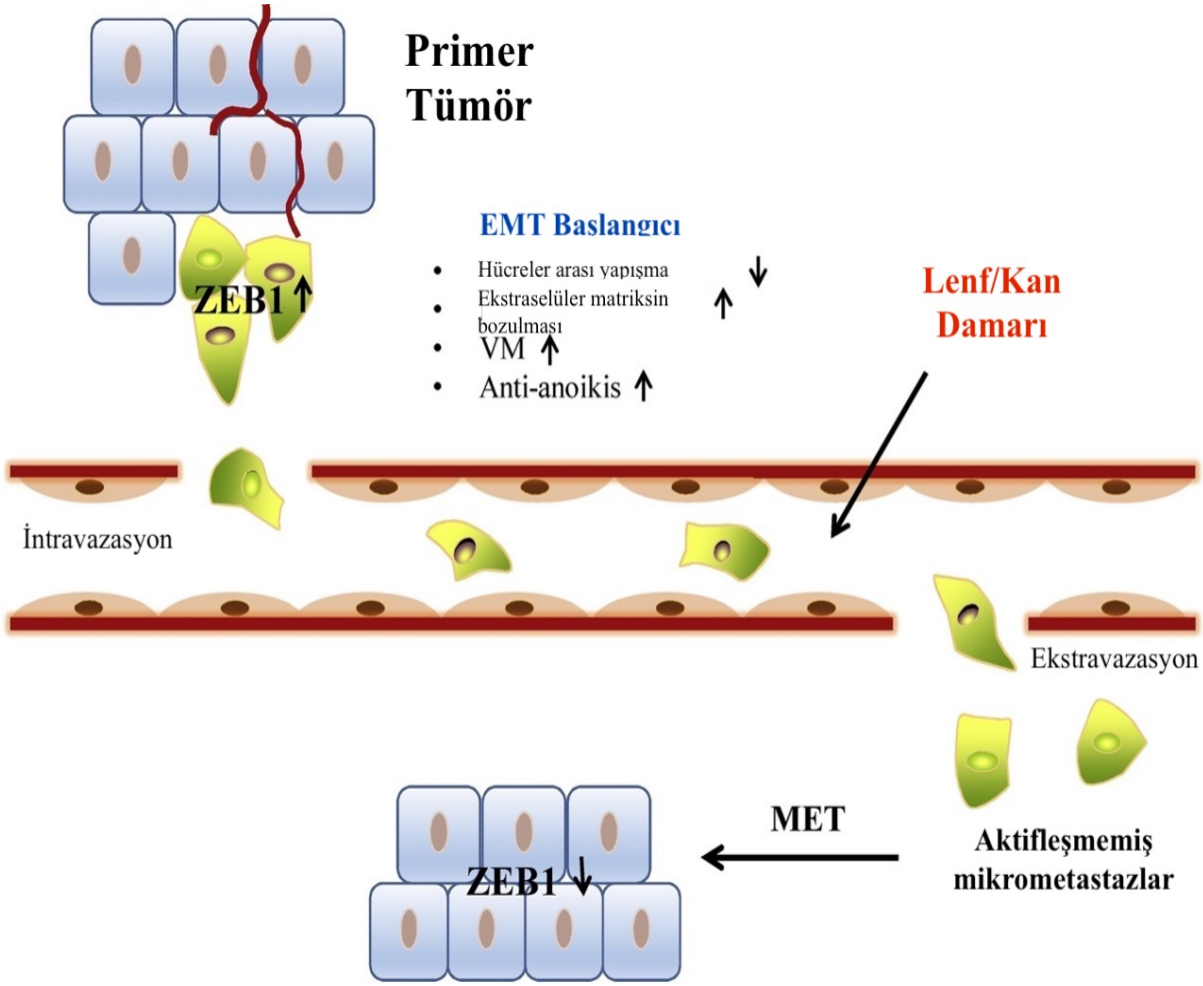
ZEB proteinleri, nöral krest hücrelerinin göçü ve embriyonik gelişimde oldukça önemlidir. Malign tümör gelişimini destekleyici olduğu düşünülmektedir [156]. ZEB1 transkripsiyon faktörü 1991 yılında keşfedilmiştir [157]. Meme, prostat ve kolon gibi birçok insan kanserinde EMT aktivatörü olarak bilinmektedir [158-160].

Smad etkileşimli protein SIP1 ya da diğer adıyla ZEB2, Xenopus'ta Smad1'in domaini MH2'yi bağlayabilen transkripsiyon faktörlerini tanımlarken keşfedilmiştir. ZEB1'in yakın bir homoloğu ve transkripsiyon baskılayıcısı olarak tanımlanmıştır [161].

Kanser hücrelerindeki plastisitenin artması, malign kanser progresyonunun önemli bir faktörü olarak bilinmektedir. Hücre plastisitesi, EMT düzenleyicilerinden biri olan ZEB1'e bağlıdır. ZEB1 aracılığıyla indüklenen EMT mekanizması; ZEB1'in, e-kadherin promoter bölgesine bağlanarak, e-kadherin'in transkripsiyonel ekspresyonunu baskılayıp hücrelerin epitel özelliklerini kaybetmesine neden olmasıdır [162].

ZEB1'in, mezenkimal özelliklere sahip tümör hücrelerini uyardığı ve metastazı desteklediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [163, 164]. ZEB1 ile indüklenen EMT, epitel hücre adhezyonu ve polarite kaybını arttırarak, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini, göçü, metastazı ve invazyonu indükler (Şekil 2.12) [165]. ZEB1, tümör invazyonu olan kısımlarda ve tümör çevresindeki malign hücrelerde yoğun bir şekilde eksprese edilir. Artan ZEB1 ekspresyonuna, azalan e-kadherin ekspresyonu eşlik eder [166]. ZEB transkripsiyon faktörleri

miRNA'lar üzerinde baskılayıcı etki kurarak EMT'yi düzenleyebilirler. Bu yolla, hücrelerin invaziv ve metastatik yetenekler kazanmasına neden olurlar [167].

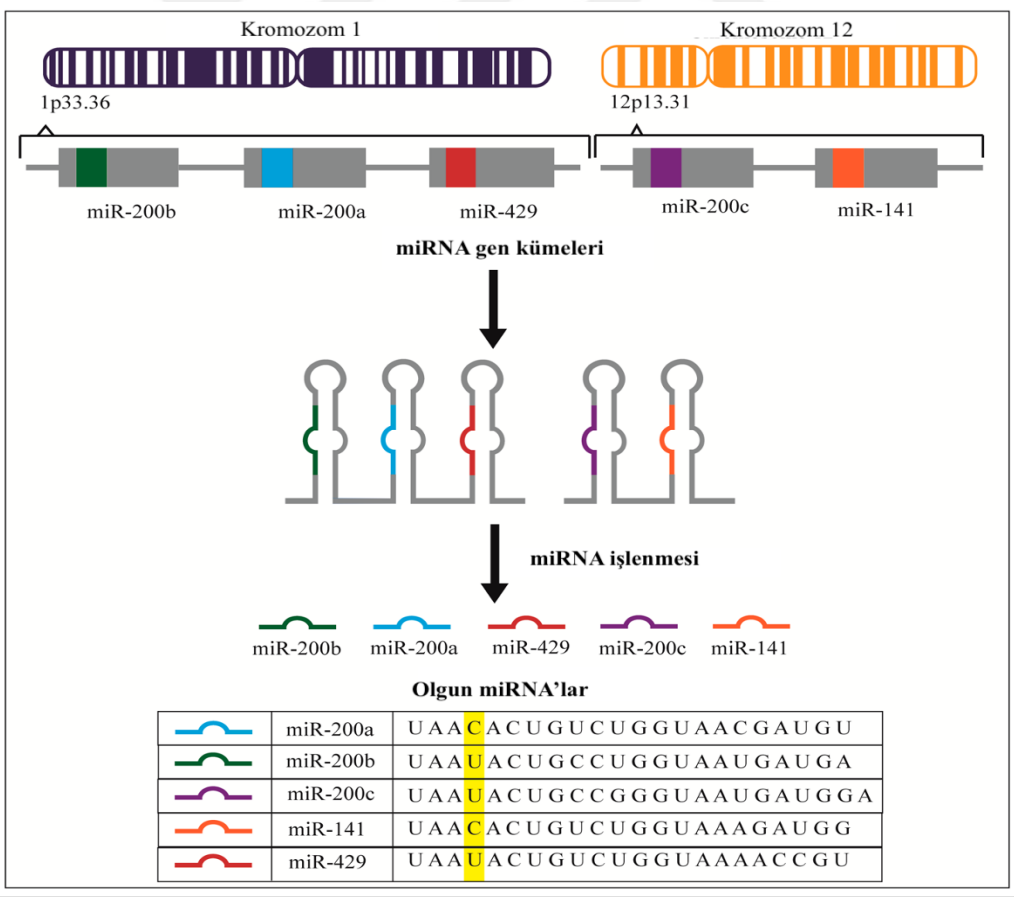


Şekil 2.9: ZEB1'in invazyon ve metastazdaki süreci [168]. EMT uyarıcı sinyaline yanıt olarak, ZEB1 seviyesi, invaziv kanser hücreleri veya yakınındaki invaziv hücrelerde artar. Artan ZEB1 ekspresyonu primer tümörün çevresindeki hücrelerde adezyon kaybına, ekstraselüler matriksin bozulmasına ve vaskülojenik taklit oluşumuna neden olur. Metastatik hücreler primer tümörden uzaklaştıkça, ZEB1 ekspresyonu azalır.

2.5.6. RNA seviyesinde EMT Düzenlenmesi

MikroRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen, kodlanmayan küçük RNA'lardır. İnsan genlerinin üçte birinden fazlasının miRNA'lar aracılığıyla düzenlendiği düşünülmektedir [169]. Yapılan çalışmalar mikroRNA'ların tümörün büyümesi ve malign karakter kazanmasında önemli rol aldıklarını göstermektedir [170, 171]. MikroRNA'lardan bazıları onkogen, bazıları tümör baskılayıcı olarak görev yapar. En önemli görevleri EMT'nin ana düzenleyicileri olmalarıdır. EMT ve sürecin tersi olan MET arasındaki dengeyi sağlarlar [172].

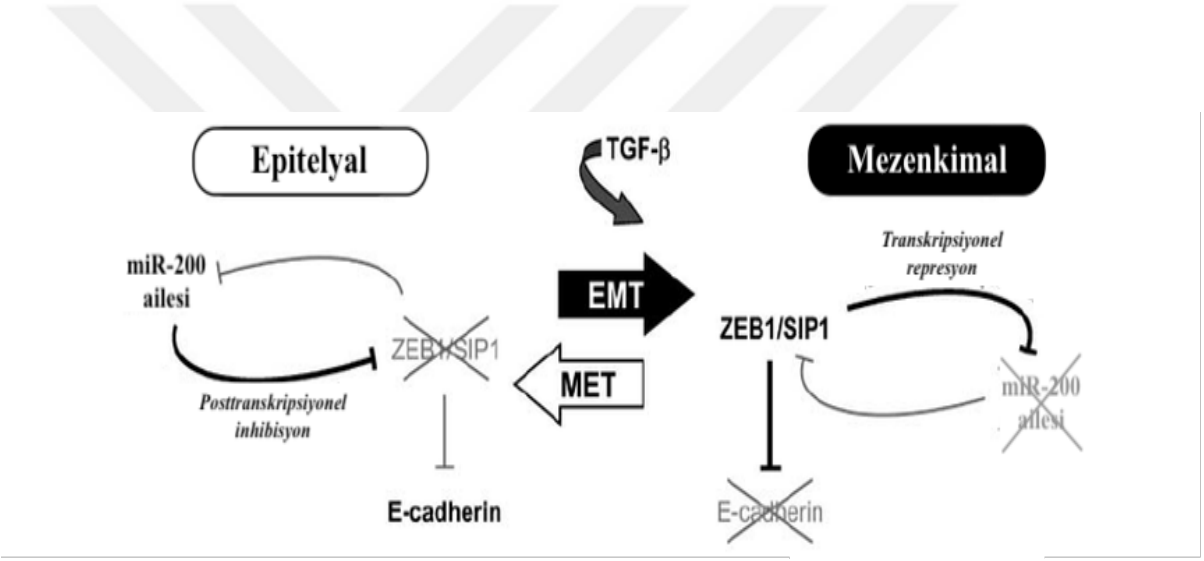
MiR-200 ailesi, EMT'nin epitel belirteci ve düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır [20]. Bu aile miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429 olmak üzere 5 üyeden oluşur. miR-200a, miR-200b ve miR-429, kromozom 1'de (1p36.33), miR-200c ve miR-141, kromozom 12'de (12p13.31) konumlanmıştır. Yüksek derecede dizi homolojisi gösterirler [173, 174].



Şekil 2.10: miR-200 ailesi üyeleri [156].

MiR-200 ailesi ile ZEB1 ve ZEB2 arasında çift yönlü negatif geri bildirim mekanizması olduğu ortaya çıkarılmıştır. ZEB1 ve ZEB2, miR-200 ailesinin ortak promotör bölgelerine bağlanarak miR-200'ün transkripsiyonunu inhibe eder. MiR-200 ifadesinin arttığı durumlarda ise, ZEB1 ve ZEB2'nin transkripsiyon sonrası baskılanmasına neden olur. Çift yönlü geri bildirim mekanizması sonucu epitel veya mezenkimal fenotip ortaya çıkar [175].

Moes ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, miR-203 ile SNAI1/SNAI2 arasında kanser metastazı ve EMT'yi düzenleyen farklı bir geri bildirim mekanizması olduğu gösterilmiştir. Her iki mikroRNA'nın (miR-200 ve miR-203), TGF-β ile indüklenen EMT'de ekspresyonlarının azaldığı ve EMT için vazgeçilmez bir süreç olduğu düşünülmektedir [171].



Şekil 2.11: miR-200 ailesi ile ZEB1 ve ZEB2 arasında çift yönlü negatif geri bildirim mekanizması.[4]

MiR-200 ve miR-203 dışında kanser ve EMT'de rol alan farklı miRNA'lar da keşfedilmiştir. MiR-30a ve miR-34'ün doğrudan SNAI1'i hedefleyerek EMT'yi inhibe ettiği gösterilmiştir [176]. Siemens ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada miR-612'nin AKT2'yi baskılayarak EMT'yi inhibe ettiği bildirilmiştir [177].

[4] https://www.researchgate.net/figure/Model-for-a-double-negative-feedback-loop-between-ZEB1-SIP1-and-the-miR-200b-f-200a-f-429_fig4_23294203 [Ziyaret tarihi: 7 Şubat 2021].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1.ÖRNEK ELDE ETME

Tez için İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda hormon ya da kemoterapi görmeden önce ameliyata alınan over kanseri hastalar ve over kanseri dışında herhangi bir sebeple total abdominal histerektomi uni/bilateral ooferektomi ameliyatına alınan sağlıklı overe sahip hastaların doku örnekleri alındı. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan 08/11/2019 tarihli 18 sayılı kararla etik kurul onayı ve kurul onayı sonrası çalışmaya katılan tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı. Çalışma için gerekli olan klinik veriler İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı veri tabanından elde edildi.

Over kanser hastalarından elde edilen doku örnekleri %10 nötral tamponlu formaline fikse edilmek üzere ve moleküler genetik çalışmalarda kullanılmak üzere *"*RNAlater*"* solüsyonuna aktarıldı. Tümör dokularından elde edilen 500 mg doku örneği izolasyon aşamasına kadar 80 ^{o}C'de bekletildi.

15 sağlıklı over dokusu, 15 tümörlü over dokusu ile çalışıldı. Sınıflandırma ve evreleme için örneklerin patoloji raporları değerlendirildi. 15 tümörlü over dokusunun (13'ü seröz [%86,6], 1'i müsinöz [%6,6], 1'i heterolog karsinom [%6,6]) idi.

3.2. OVER DOKUSUNDAN TOTAL RNA İZOLASYONU

Dokudan total RNA izolasyonu için "PureLink RNA Mini Kit" kullanıldı. İzolasyonda 15 sağlıklı over ve 15 epitelyal over kanserli hasta dokuları ile çalışıldı. Kit içerisinde bulunan kullanım talimatlarına uyularak RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Firmanın önerdiği protokol takip edildi.

1. İzolasyona başlamadan önce her 1 ml "Lysis Buffer" solüsyonuna 10 µl "β-merkaptoetanol" eklenerek bir "Buffer" çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan "Buffer" çözeltisi 1 dakika bekletilip ardından vorteks yapıldı.

2. İzolasyon aşamasına kadar -80^{0}C'de bekletilen over doku örnekleri buz üzerine alındı.

3. Over dokusu örneği daha önceden -20^{0}C‘de soğutulmuş havanda steril bir bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Havana sıvı azot eklendi. Hızlıca dokular ezilerek mümkün olduğunca toz haline getirilmeye çalışıldı. Her doku için ayrı havan kullanıldı ve bu işlem tüm dokular için yapıldı.

4. Örnekler 2 ml’lik ependorflara aktarıldı. Hassas terazi ile tartılarak miktarları ölçüldü. Doku miktarları 30-100 mg aralığında olmasına dikkat edildi.

5. Terazide ölçülen örnek miktarına göre “Buffer” solüsyonu hazırladı. Solüsyona eklenecek olan “Lysis Buffer” çözeltisinin önerilen miktarları Tablo 3.1‘de belirtilmiştir.

6. Ependorftaki dokular üzerine “Buffer” solüsyonu eklendi ve en az 45 saniye vortekslendi.

7. Örnekler oda sıcaklığında 2600 g’de 5 dakika santrifüj edildi.

8. Süpernatant yeni bir 2 ml’lik ependorfa aktarıldı.

9. Ependorfa, süpernatant hacmi kadar %70 etanol eklendi ve homojenizasyon için vorteks yapıldı.

10. Epedorftaki örneğin 700 µl’si “Spin Cartridge”e aktarıldı.

11. Oda sıcaklığında, 12.000 g’de 15 saniye santrifüj edildi ve “Collection” tüpte kalan sıvı atıldı.

12. 9. ve 10. basamaktaki aşamalar ependorftaki örnek bitene kadar tekrarlandı.

13. “Spin Cartridge” yeni bir “Collection” tüpe aktarıldı.

14. “Spin Cartridge” tüp içerisine 700 µl “Wash Buffer I” eklendi. 12.000 g’de 15 saniye santrifüj edildi. Filtre yeni bir “Collection” tüpe aktarıldı.

15. Kitin içerisinde bulunan %96-100 etanol, “Wash Buffer II” ye eklenerek solüsyon hazırlandı.

16. "Spin Cartridge" tüp içerisine 500 µl "Wash Buffer II" eklendi. 12.000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. "Collection" tüpte kalan sıvı atıldı.

17. 15. basamakta belirtilenler tekrarlandı.

18. "Spin Cartridge" 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. "Collection" tüp atıldı ve "Spin Cartridge" yeni bir "Spin Cartridge Recovery" tüpe aktarıldı.

19. "RNase-Free Water" dan, filtrenin tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Eklenmesi gereken miktar (Elüsyon parametreleri) Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

20. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi.

21. Oda sıcaklığında 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve filtre atıldı.

22. Elde edilen total RNA, bir sonraki laboratuvar aşamasına kadar -80^{0}C'de saklandı.

Tablo 3.1: Örnek miktarına göre kullanılması gereken "Lysis Buffer" miktarları.

ÖRNEK MİKTARI	"LYSİS BUFFER" MİKTARI
≤ 10 mg	0,3 mL
10 – 30 mg	0,6 mL
30 – 200 mg	Her 30 mg için 0,6 mL

Tablo 3.2: Elüsyon parametreleri.

ELÜSYON HACMİ	RNA KONSANTRASYONU
30 – 100 µl	≤ 100 µg
2 x 100 µl	100 – 500 µg
3 x 100 µl	500 – 1000 µg

3.3. MİRNA ANLATIM ANALİZİ

3.3.1. cDNA Sentezi

Total RNA'lar izole edildikten sonra elde edilen RNA'lardan "TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit" kullanılarak cDNA sentezlendi. Bu işlem için kit içerisinde bulunan kullanım talimatları takip edildi. Referans olarak U6 snRNA kullanıldı. Çalışma çözeltisi ve reaksiyon bileşenleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Çalışma çözeltisi ve reaksiyon bileşenleri.

ÇALIŞMA ÇÖZELTİSİ		**REAKSİYON BİLEŞENLERİ**	
KİMYASAL	**HACİM (µl)**	**KİMYASAL**	**HACİM (µl)**
"Reverse Transcription Enzyme"	1	Çalışma Çözeltisi	7
"dNTP Mix"	0,15	Primer (5X)	3
"RNase İnhibitor"	0,19	Total RNA (4 ng/µl)	5
"10X RT Buffer"	1,5	**TOPLAM**	**15**
"Nuclease-free water"	4,16		
TOPLAM	**7**		

Hsa-miR-200c-3p, miRNA'sından cDNA sentezi için aşağıdaki prosedür uygulandı.

1. 5X primer, izole total RNA ve kit içerisinde bulunan diğer çözeltiler buzda çözdürüldü.
2. Kit içerisindeki kullanım talimatına uygun olarak çalışma solüsyonu "master mix" hazırlandı.
3. Hazırlanan solüsyon steril tüplere paylaştırıldı.
4. Steril tüplere, total RNA örneği ve "nuclease-free water" eklendi.

Oluşan reaksiyon tüpleri termal döngü cihazına alınarak Tablo 3.4'te belirtilen protokol uygulandı. Elde edilen cDNA örnekleri bir sonraki kullanım aşamasına kadar -20ºC'de saklandı.

Tablo 3.4: cDNA sentezi termal döngü.

BASAMAK	**SÜRE VE SICAKLIK**
"Priming"	30 dakika, 16ºC
"Reverse Transcription"	30 dakika, 42 ºC
"Reverse Transcription Inactivation"	5 dakika, 85 ºC
Bekleme (Opsiyonel basamak)	Bekleme, 4 ºC

3.3.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hsa-miR-200c-3p'nin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için "TaqMan MicroRNA Master Mix" kullanıldı. Reaksiyonda kullanılan bileşenler Tablo 3.5'te belirtilmiştir.

Tablo 3.5: Reaksiyon bileşenleri ve kullanım miktarları.

BİLEŞENLER	**HER REAKSİYON İÇİN GEREKLİ MİKTAR (µL)**
"Master Mix"	10
"Primer (20x)"	1
"Nuclease-free Water"	6,5
"cDNA Sample"	2,5
TOPLAM HACİM	**20**

Reaksiyon bileşenleri oda sıcaklığında çözdürüldü. Kısa bir santrifüj uygulanarak tüp içerisindeki tüm bileşenlerin bir araya toplanması sağlandı. İşlem sırasında bileşenler buzda bekletildi ve ışıktan korunmalarına özen gösterildi. Tablo 3.5'te belirtilen miktarlardaki reaksiyon bileşenleri bir tüpe aktarılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak olan tüplere paylaştırıldı. Bileşenlerin üzerine cDNA

örnekleri ve "nuclease-free water" eklendi. Oluşabilecek hava kabarcıklarını önlemek ve tüp içerisindeki tüm bileşenleri bir araya toplamak için kısa süreli santrifüj uygulandı. Reaksiyon tüpleri *"*Stratagene Mx3005p*"* termal döngü cihazına yüklendi ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonda uygulanan termal döngü protokolü Tablo 3.6' da belirtilmiştir.

Tablo 3.6: Termal döngü protokolü.

BASAMAK	**SÜRE VE SICAKLIK**	**DÖNGÜ**
Polimeraz Aktivasyonu	2 dakika, 50 ºC	1
DNA Denatürasyonu	10 dakika, 95 ºC	
Denatürasyon	15 saniye, 95 ºC	40
Bağlanma ve Uzama	60 saniye, 60 ºC	40

3.4. GEN ANLATIM ANALİZİ

ZEB1 geninin anlatım analizinde 15 sağlık ve 15 epitelyal kanserli over dokuları ile çalışıldı. Over dokularına uygulanan total RNA izolasyonu protokolü takip edildi (Bknz 3.2.).

3.4.1. cDNA Sentezi

Sağlıklı ve hasta over dokularından elde edilen total RNA örneklerinden "iScript cDNA Synthesis Kit" kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Reaksiyon için gerekli bileşenler ve termal döngü prosedürü kit içerisindeki kullanım talimatına uyularak gerçekleştirildi. cDNA sentezi için gerekli bileşenler Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Reaksiyon bileşenleri ve kullanım miktarları.

BİLEŞENLER	HER REAKSİYON İÇİN GEREKLİ MİKTAR (µL)
"iScript Reaction Mix (5x)"	4
"iScript Reverse Transcriptase"	1
"Nuclease-free water"	Değişkenlik gösterir
RNA Örneği (1µg total RNA)	Değişkenlik gösterir
TOPLAM HACİM	**20**

Örnekler belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra termal döngü cihazına alınarak Tablo 3.8'de belirtilen protokol uygulandı. Termal döngü sonunda sentezlenmiş olan cDNA örnekleri, zarar görmemeleri için bir sonraki işleme kadar -20 ºC'de muhafaza edildi.

Tablo 3.8: cDNA sentezi termal döngü.

BASAMAK	SÜRE VE SICAKLIK
"Priming"	5 dakika, 25ºC
"Reverse Transcription"	20 dakika, 46 ºC
"Reverse Transcription Inactivation"	1 dakika, 95 ºC
Bekleme (Opsiyonel basamak)	Bekleme, 4 ºC

3.4.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ZEB1 genine ait gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için öncelik olarak primer tasarlandı. Primer tasarımı için https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ web adresi kullanıldı ve ZEB1 geninin nükleotid dizisi elde edildi. https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi web adresinde gerekli primer tasarlandı. Referans gen olarak GAPDH geninin primerleri kullanıldı. ZEB1 genine ait "forward" ve "reverse" primerler Tablo 3.9'da belirtilmiştir.

Tablo 3.9: ZEB1 geni için tasarlanan primerler.

GEN ADI	FORWARD PRİMER	REVERSE PRİMER
ZEB1	5'-AACTGCTGGGAGGATGACAC-3'	5'-TCCTGCTTCATCTGCCTGA-3'

İşlem öncesi primerler her örnek için 300-500 nM olacak şekilde sulandırıldı. Eş zamanlı olarak cDNA örneklerinin her biri 100 ng olacak şekilde sulandırım oranları hesaplandı ve gerekli sulandırım işlemleri yapıldı. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için "iTaq Universal SYBR Green Supermix" kit kullanıldı. Reaksiyon için gerekli bileşenler ve termal döngü prosedürü kit içerisinde yer alan kullanım talimatına göre gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli bileşenler Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için gerekli bileşenler ve kullanım miktarları.

BİLEŞENLER	HER REAKSİYON İÇİN GEREKLİ MİKTAR (µL)
"iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x)"	10
Forward ve reverse primerler	Değişkenlik gösterir
"Nuclease-free water"	Değişkenlik gösterir
cDNA Örneği (100 ng)	Değişkenlik gösterir
TOPLAM HACİM	**20**

Gen anlatımı için *"*Stratagene Mx3005p*"* termal döngü cihazı kullanıldı. Uygulanan prosedür aşağıda belirtilmiştir.

1. Reaksiyon bileşenleri oda sıcaklığında çözdürüldü. Kısa bir santrifüj uygulayarak tüp içerisindeki tüm bileşenlerin bir araya toplanması sağlandı.
2. İşlem sırasında bileşenler buzda bekletildi ve ışıktan korunmalarına özen gösterildi.
3. Tablo 3.10'da belirtilen miktarlardaki reaksiyon bileşenleri bir tüpe aktarılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.
4. Karışım polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılacak olan tüplere paylaştırıldı.
5. Bileşenlerin üzerine cDNA örnekleri ve "Nuclease-free water*"* eklendi.
6. Tüm karışım en az 30 saniye vortekslenerek bileşenlerin homojen olması sağlandı.
7. Oluşabilecek hava kabarcıklarını önlemek ve tüp içerisindeki tüm bileşenleri bir araya toplamak için kısa süreli santrifüj uygulandı.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için uygulanan termal döngü protokolü Tablo 3.11'de belirtilmiştir.

Tablo 3.11: Termal döngü protokolü.

BASAMAK	**SÜRE VE SICAKLIK**	**DÖNGÜ**
Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu	20-30 saniye, 95 ºC	1
Denatürasyon	2-5 saniye, 95 ºC	40
Bağlanma ve Uzama	15-30 saniye, 60 ºC	40

3.5. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Tez kapsamında, %10 nötral tamponlu formalin ile fikse edilmiş dokular, artan alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Ksilen ile şefafflaştırıldı ve parafin infiltre edilerek doku takibi tamamlandı. Dokular parafin blok haline getirildi. Elde edilen parafin bloklardan pozitif yüklü lamlara 3µm'lik kesitler alındı. Her lama ilgili antikora özgü pozitif kontrol dokusu da kesildi ve aynı boyama basamaklarından geçirildi. Ayrıca her antikor için negatif kontrol kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama işlemi için Ventana Benchmark Ultra (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) tam otomatize boyama immunohistokimyasal boyama cihazı kullanıldı. Kesitler deparafine edildi. "Cell Conditioning 1" (CC1) solüsyonunda 30 dakika bekletilerek "antijen retrieval" (antijen geri kazanımı) aşaması gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal boyama için "Ultraview Universal DAB Detection Kit" kullanıldı. Boyama işleminde kullanılan primer antikorlar, sulandırım oranları, klon ve pozitif kontrol bilgileri Tablo 3.12'de belirtilmiştir. Boyama işleminden sonra Hematoksilen boyası ile arka plan boyası gerçekleştirildi. Hematoksilen rengini mordan maviye dönüştürmek için "Bluing" solüsyonu kullanıldı.

Tablo 3.12: İmmunohistokimyasal boyamada kullanılan antikorlar ve özellikleri.

ANTİKOR ADI	MARKA	KLON	SULANDIRIM ORANI	POZİTİF KONTROL DOKU
ZEB1	İnvitrogen	Rabbit poliklonal	1:3000	Endometrium
E-kadherin	Ventana	EP700Y / Rabbit monoklonal	Kullanıma hazır	Meme karsinomu
Vimentin	Ventana	V9 / Mouse monoklonal	Kullanıma hazır	Deri

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu sonucu elde edilen sürekli sayısal verilerin dağılımı basıklık ve çarpıklık ile değerlendirildi. Normal dağılım ±2 olarak kabul edildi. Normal dağılıma sahip olduğu görülen gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu verileri ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi ve "bağımsız örneklem t testi" ile karşılaştırıldı.

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları kategorik veriler olduğundan medyan (mimum-maksimum) olarak ifade edildi ve "Mann Whitney U" testiyle karşılaştırıldı. Tüm verilerin korelasyon analizinde "Spearman korelasyon analizi" kullanıldı. Sürekli sayısal verilere ROC (Reciever Operating Characteristic) analizi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0,05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz için "Microsoft Excel" ve "IBM SPSS Versiyon 22" kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. MİRNA ANLATIM ANALİZİ

4.1.1. Kullanılan Örneklerin Özellikleri

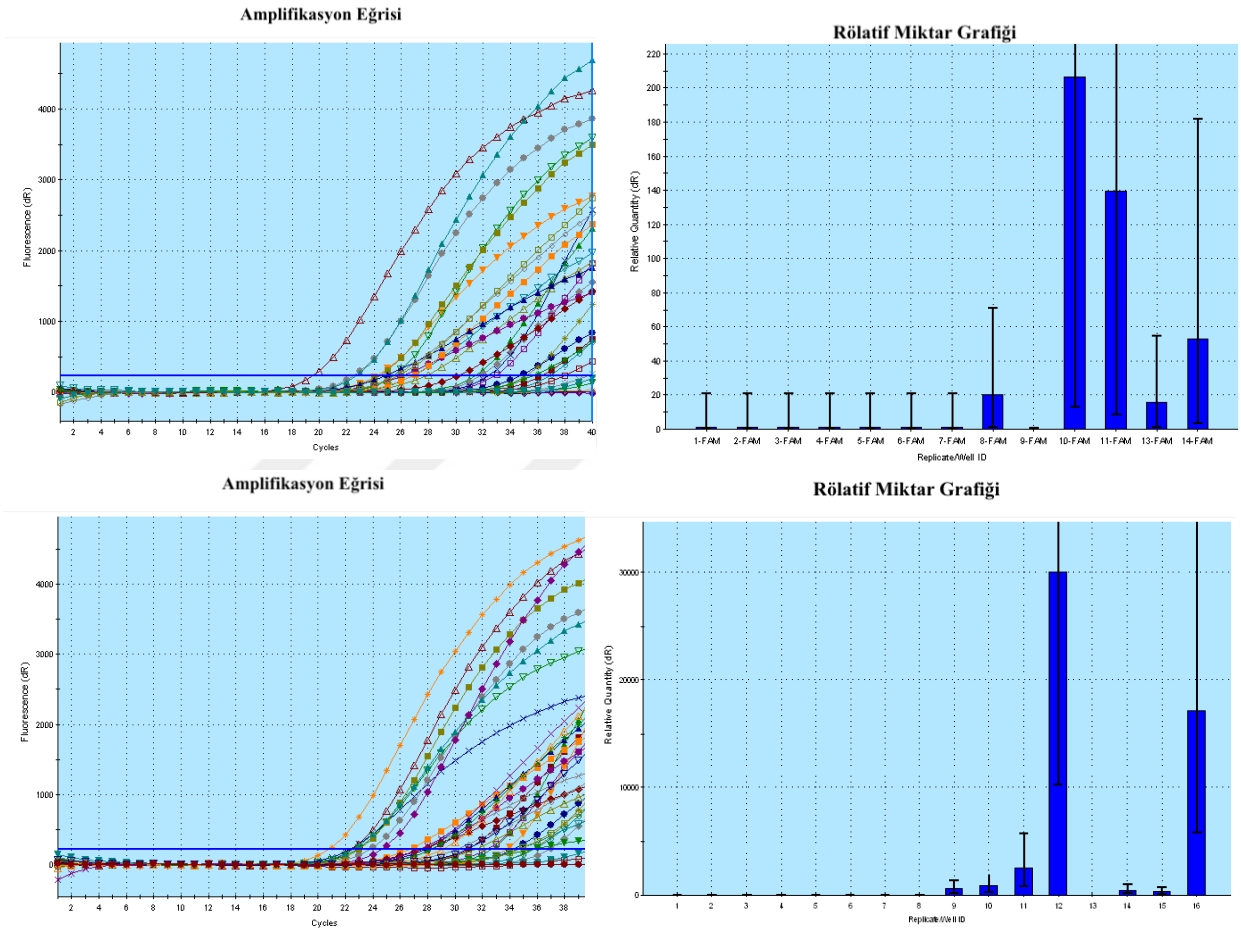
Tez için uygun görülen örnekler İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndan temin edildi. Örnek grubu; over kanseri dışındaki bir sebeple total abdominal histerektomi ve ooferektomi operasyonu geçiren 15 hastanın sağlık over dokuları ile pimer over kanseri tanısı almış 15 over kanseri hastanın over dokusu örneklerinden oluşmaktaydı. Toplam 30 over dokusu örneği ile çalışıldı. Çalışmaya katılan kadın hastaların yaş aralığı 43-74'tü. Gerçekleştirilen tezdeki over kanserli hastaların demografik ve klinik bilgileri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Over kanserli hastaların demografik ve klinik bilgileri.

HASTA NO	PATOLOJİK TANI	FIGO EVRE	YAŞ
1	Seröz Adenokarsinom	III-IV	60
2	Seröz Adenokarsinom	III-IV	59
3	Seröz Adenokarsinom	III-IV	65
4	Seröz Adenokarsinom	III-IV	52
5	Seröz Adenokarsinom	III	46
6	Seröz Adenokarsinom	III-IV	67
7	Seröz Adenokarsinom	III-IV	53
8	Seröz Adenokarsinom	III-IV	61
9	Seröz Adenokarsinom	III-IV	58
10	Müsinöz Tümör		47
11	Seröz Adenokarsinom	III-IV	70
12	Seröz Adenokarsinom	III-IV	74
13	Seröz Adenokarsinom	III-IV	58
14	Seröz Adenokarsinom	III-IV	43
15	Heterelog Karsinosarkom		62

4.1.2. Anlatım Analizi Sonuçları

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda hsa-miR-200c-3p için referans gen olarak U6 snRNA kullanıldı. Over kanserli ve sağlıklı dokulardan elde edilen "Cycle treshold" (Ct) değerleri kullanılarak ΔΔCt yöntemi ile genlerin kat değişimleri hesaplandı. Reaksiyon sonunda elde edilen amplifikasyon eğrileri ve rölatif miktar grafikleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

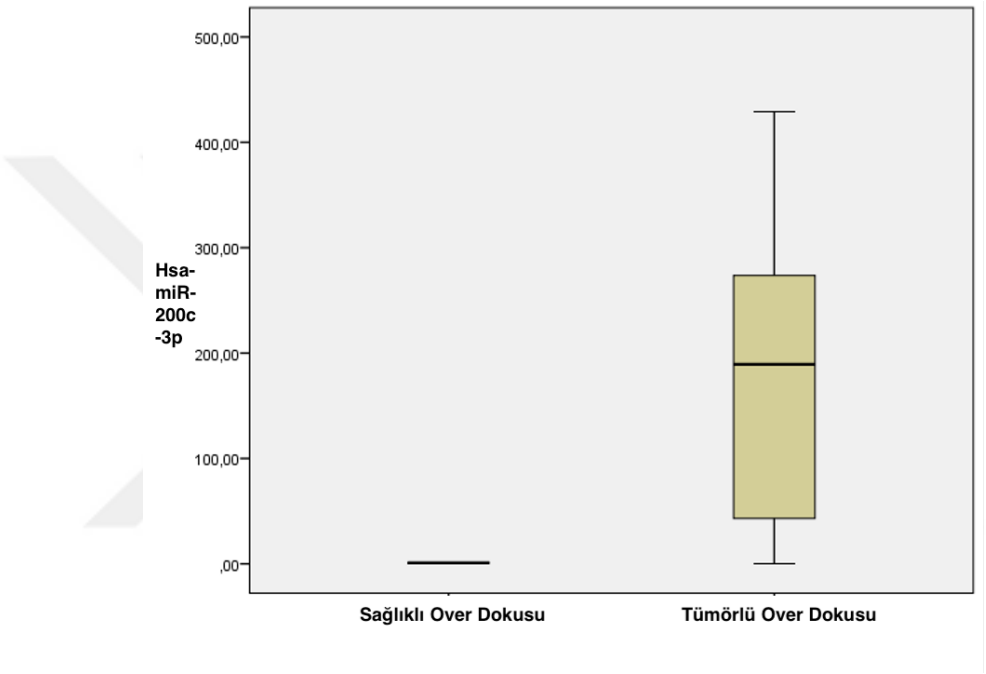


Şekil 4.1: Hsa-miR-200c-3p'nin amplifikasyon eğrileri ve rölatif miktar grafikleri.

Over kanserli dokularda hsa-miR-200c-3p'nin anlatımı (182,35±147,61), sağlıklı dokulara göre (1 ± 0) istatiksel olarak anlamlı artmıştır [t(10)=4,075, p<0,01]. Tablo 4.2'de hsa-miR-200c-3p'nin bağımsız örneklem t test sonuçları verilmiştir. Sonuçların "box plot" grafiği Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Hsa-miR-200c-3p'nin bağımsız örneklem t test sonuçları.

Hsa-miR-200c-3p	SAĞLIKLI (Bazal grup)	HASTA (Kat değişimi)	p DEĞERİ
n=11	1 ± 0	182,35 ± 147,61	< 0,01

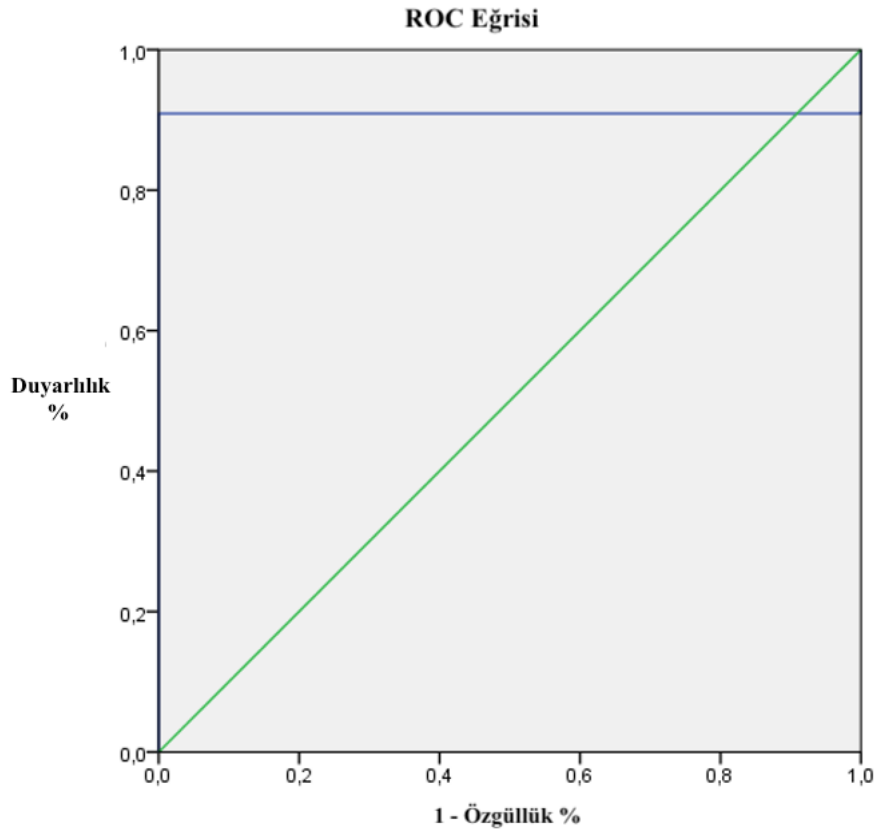


Şekil 4.2: Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserli ve sağlıklı dokulardaki anlatımını gösteren box plot grafiği.

Yapılan ROC analizi sonuçlarına göre hsa-miR-200c-3p'nin ≥8,35 kesme noktası over kanserini %90 duyarlılık ve %100 özgüllük ile göstermektedir. ROC analizi sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserini öngörmedeki ROC eğrisi analizi Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserini öngörmedeki ROC analizi sonuçları.

	AUC (95% CI)	**KESME NOKTASI**	**DUYARLILIK**	**ÖZGÜLLÜK**
Hsa-miR-200c-3p	0,909 (0.739-1)	≥8,35	%90	%100



Şekil 4.3: Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserini öngörmedeki ROC eğrisi analizi.

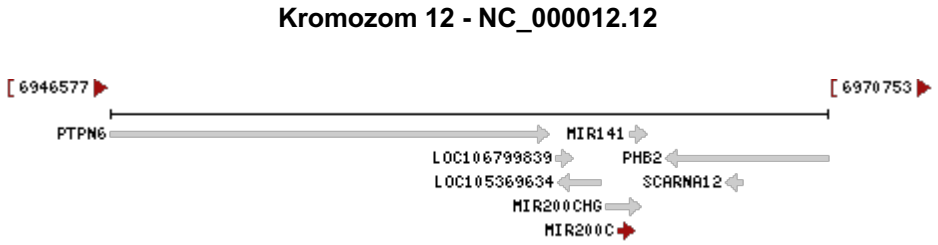
4.2. BİYOLOJİK VERİ TABANLI YÖNTEMLER İLE MİRNALAR'IN HEDEF GEN TESPİTİ

Çalışmanın bu aşamasında aday miRNA'nın hedeflediği mRNA'yı belirlemek için biyolojik veri tabanları kullanılmıştır. miR-200 ailesinin 5 üyesi vardır. Bunlar miR-141, miR-200c, miR-200a, miR-200b, ve miR-429'dur. miR-200 ailesinin olgun dizi ve erişim bilgileri miRBase biyolojik veri tabanından elde edilmiştir (http://www.mirbase.org/). Elde edilen bilgiler Tablo 4.4'te gösterilmektedir.

Tablo 4.4: miR-200 aile üyelerinin miRBase erişim bilgileri.

MİRNA	OLGUN DİZİ	UZUNLUK	MİRBASE ERİŞİM
Hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG	22	MIMAT0000432
Hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGA	23	MIMAT0000617
Hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	22	MIMAT0000682
Hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	22	MIMAT0000318
Hsa-miR-429	UAAUACUGUCUGGUAAAACCGU	22	MIMAT0001536

Hsa-miR-200c-3p, insanda bulunan 23 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA dizisidir. Hsa-miR-200c, insanda 12. kromozomun kısa kolunda (p) yer alır (12p13.31). miRNA'nın kromozomdaki lokalizasyonu Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Hsa-miR-200c'nin genomdaki lokalizasyonu.[5]

[5] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406985 [Ziyaret tarihi: 12 Aralık 2020].

Hsa-miR-200c-3p'nin "miRDB" biyolojik veri tabanı kullanılarak tespit edilen ilk 10 geni ve bu genlerin hedef puanları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

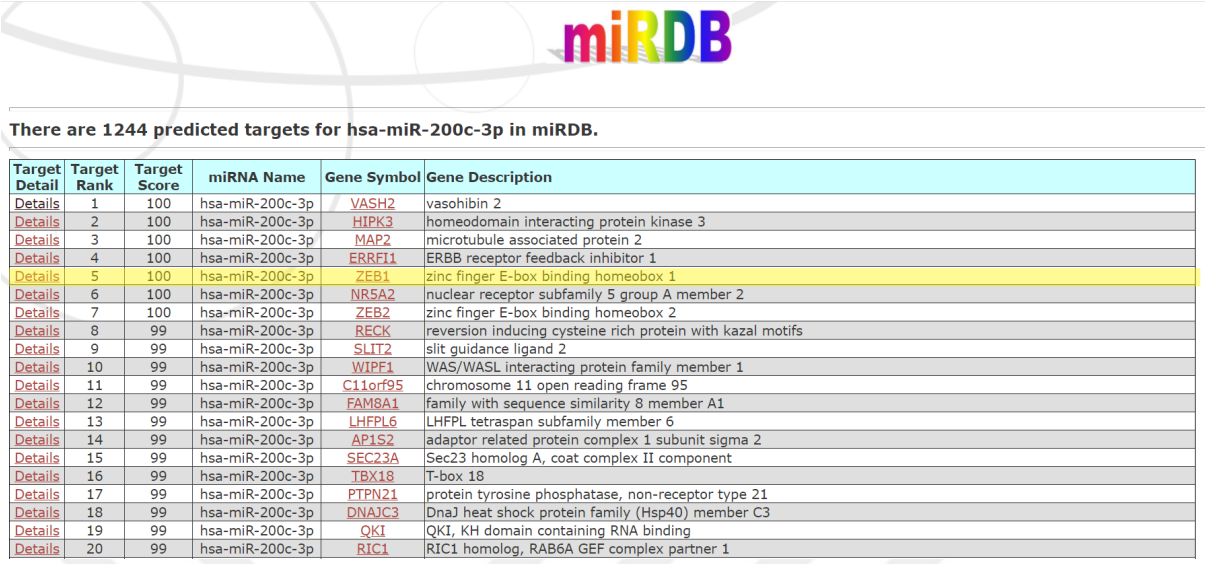
Tablo 4.5: Hsa-miR-200c-3p'nin hedeflemiş olduğu ilk 10 gen.[6]

HEDEF GEN	GEN ADI	HEDEF PUANI
VASH2	Vasohibin 2	100
HIPK3	Homeodomain interacting protein kinase 3	100
MAP2	Microtubule associated protein 2	100
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	100
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1	100
NR5A2	Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2	100
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2	100
RECK	Reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs	99
SLIT2	Slit guidance ligand 2	99
WIPF1	WAS/WASL interacting protein family member 1	99

4.3. GEN ANLATIM ANALİZİ

Biyolojik veri tabanı çalışmaları sonucu hsa-miR-200c-3p'nin hedef genlerinden birinin ZEB1 olduğu tespit edildi. Bu hedefleri belirlemede "miRDB" biyolojik veri tabanı kullanıldı. Elde edilen veri tabanı sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Tez kapsamında, gen anlatım analizi amacıyla elde edilen insan over dokularındaki hsa-miR-200c-3p'nin anlatım miktarı ile ZEB1 geninin anlatım miktarları karşılaştırıldı.

[6] http://www.mirdb.org/cgi-bin/search.cgi?searchType=miRNA&searchBox=hsa-miR-200c-3p&full=1 [Ziyaret tarihi: 12 Aralık 2020].



There are 1244 predicted targets for hsa-miR-200c-3p in miRDB.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
Details	1	100	hsa-miR-200c-3p	VASH2	vasohibin 2
Details	2	100	hsa-miR-200c-3p	HIPK3	homeodomain interacting protein kinase 3
Details	3	100	hsa-miR-200c-3p	MAP2	microtubule associated protein 2
Details	4	100	hsa-miR-200c-3p	ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1
Details	5	100	hsa-miR-200c-3p	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1
Details	6	100	hsa-miR-200c-3p	NR5A2	nuclear receptor subfamily 5 group A member 2
Details	7	100	hsa-miR-200c-3p	ZEB2	zinc finger E-box binding homeobox 2
Details	8	99	hsa-miR-200c-3p	RECK	reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs
Details	9	99	hsa-miR-200c-3p	SLIT2	slit guidance ligand 2
Details	10	99	hsa-miR-200c-3p	WIPF1	WAS/WASL interacting protein family member 1
Details	11	99	hsa-miR-200c-3p	C11orf95	chromosome 11 open reading frame 95
Details	12	99	hsa-miR-200c-3p	FAM8A1	family with sequence similarity 8 member A1
Details	13	99	hsa-miR-200c-3p	LHFPL6	LHFPL tetraspan subfamily member 6
Details	14	99	hsa-miR-200c-3p	AP1S2	adaptor related protein complex 1 subunit sigma 2
Details	15	99	hsa-miR-200c-3p	SEC23A	Sec23 homolog A, coat complex II component
Details	16	99	hsa-miR-200c-3p	TBX18	T-box 18
Details	17	99	hsa-miR-200c-3p	PTPN21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21
Details	18	99	hsa-miR-200c-3p	DNAJC3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C3
Details	19	99	hsa-miR-200c-3p	QKI	QKI, KH domain containing RNA binding
Details	20	99	hsa-miR-200c-3p	RIC1	RIC1 homolog, RAB6A GEF complex partner 1

Şekil 4.5: Hsa-miR-200c-3p'nin hedeflediği ZEB1 geninin web görüntüsü (miRDB).

4.3.1 Örneklerin Kalite Kontrolü

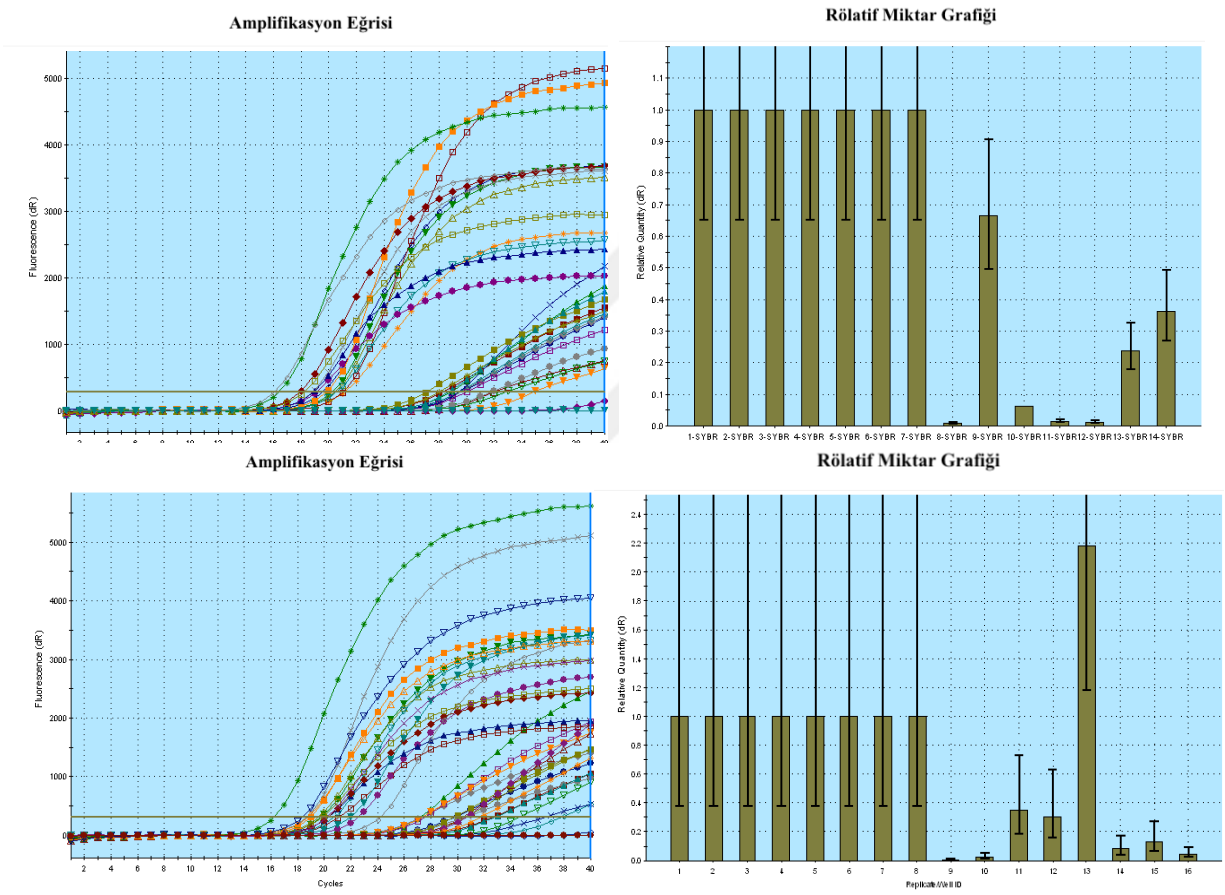
Sağlıklı ve over kanseri dokulardan izolen edilen toplamda 30 RNA örneğinin konsantrasyonlarını tespit edebilmek amacıyla "Thermo NanoDrop 2000 Spectrophotometer" cihazı kullanıldı. Cihaz kalibrasyonu için 1,5 µl "RNase Free Water" kullanılarak "Blank" yapıldı. Kalibrasyon işlemi tamamlanan her örnekten 1,5 µl alınarak kantitasyon sonuçları ölçüldü. Elde edilen RNA konsantrasyonları ve A260/A280 oranları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6: Sağlıklı ve over kanserli doku örneklerinin kantitasyon sonuçları.

	SAĞLIKLI OVER DOKULARI			HASTA OVER DOKULARI		
	Başlangıç Miktarı (mg)	**Konsantrasyon (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**	**Başlangıç Miktarı (mg)**	**Konsantrasyon (ng/µl)**	**$A_{260/280}$**
1	50	422,7	2,08	50	550,9	1,95
2	50	302,2	2,06	50	19,4	2,1
3	50	235,3	2,1	50	61,3	2,12
4	50	120,3	2,07	50	1054,2	2,1
5	50	209,2	2,09	50	709,3	2,09
6	50	72,5	2,03	50	438,9	2,09
7	50	188,4	2,10	50	469,6	2,08
8	50	141,4	2,09	50	34,4	1,93
9	50	246,9	2,01	50	309,6	2,08
10	50	125,5	2,06	50	29	2,14
11	50	306,8	2,12	50	185,6	2,09
12	50	33	2,11	50	497,5	2,08
13	50	25,5	2,13	50	139,8	2,06
14	50	80,6	2,04	50	809,6	2,07
15	50	145,4	2,08	50	199,1	1,99

4.3.2. Anlatım Analizi Sonuçları

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda ZEB1 geni için referans gen olarak GAPDH kullanıldı. Over kanserli ve sağlıklı dokulardan elde edilen "Cycle treshold" (Ct) değerleri kullanılarak ΔΔCt yöntemi ile genlerin kat değişimleri hesaplandı. Reaksiyon sonunda elde edilen amplifikasyon eğrileri ve rölatif miktar grafikleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

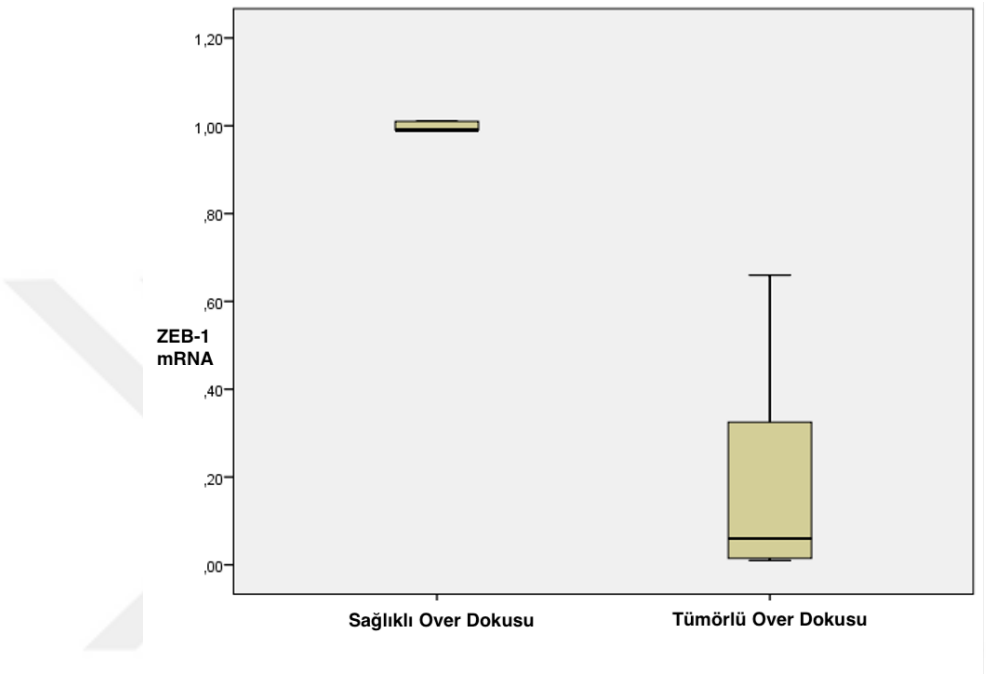


Şekil 4.6: ZEB1 geninin amplifikasyon eğrileri ve rölatif miktar grafikleri.

Over kanserli dokularda ZEB1 mRNA'sının gen anlatımı (0,3 ± 0,56), sağlıklı dokulara göre (1 ± 0,01) istatiksel olarak anlamlı azalmıştır [t(14)= -4,889; p<0,001]. Tablo 4.7'de ZEB1 genine ait mRNA'nın bağımsız örneklem t test sonuçları verilmiştir. Sonuçların "box plot" grafiği Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: ZEB1 genine ait mRNA bağımsız örneklem t test sonuçları.

ZEB1 mRNA	SAĞLIKLI (Bazal grup)	HASTA (Kat değişimi)	p DEĞERİ
n=15	1 ± 0,01	0,3 ± 0,56	< 0,01

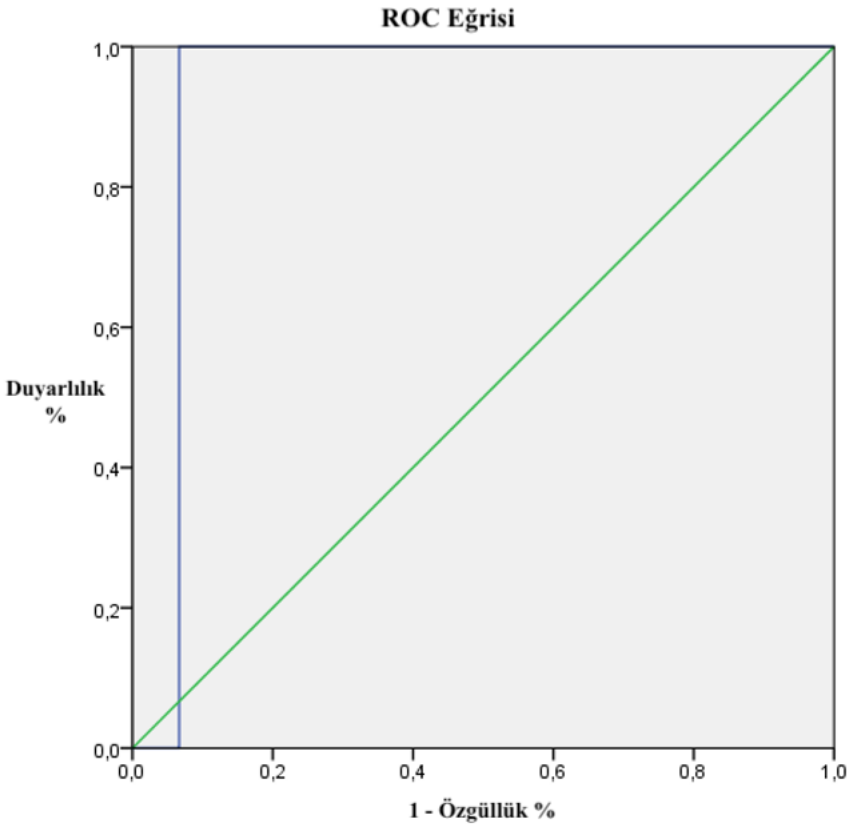


Şekil 4.7: ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserli ve sağlıklı dokulardaki anlatımını gösteren box plot grafiği.

Yapılan ROC analizi sonuçlarına göre ZEB1 genine ait mRNA'ların <0,8250 kesme noktası over kanserini %93 duyarlılık ve %100 özgüllük ile göstermektedir. ROC analizi sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir. ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserini öngörmedeki ROC eğrisi analizi Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserini öngörmedeki ROC analizi sonuçları.

	AUC (95% CI)	KESME NOKTASI	DUYARLILIK	ÖZGÜLLÜK
ZEB1 mRNA	0.933 (0.807-1)	<0,8250	%93	%100

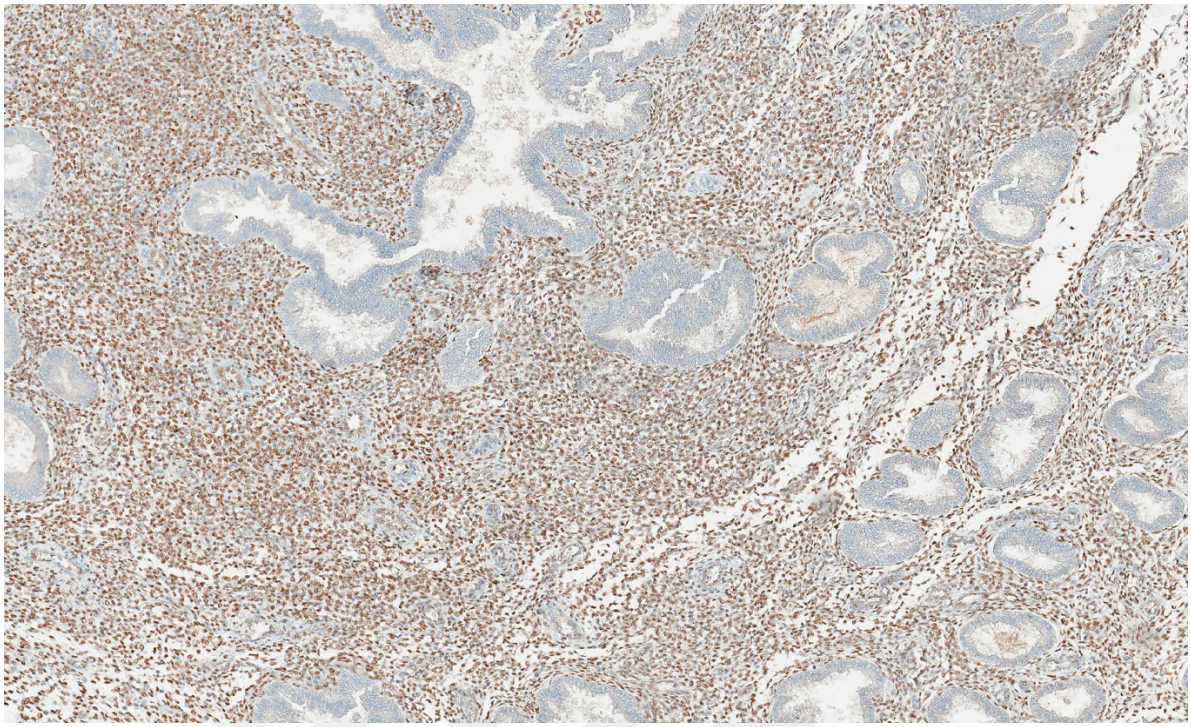


Şekil 4.8: ZEB1 genine ait mRNA'ların over kanserini öngörmedeki ROC eğrisi analizi.

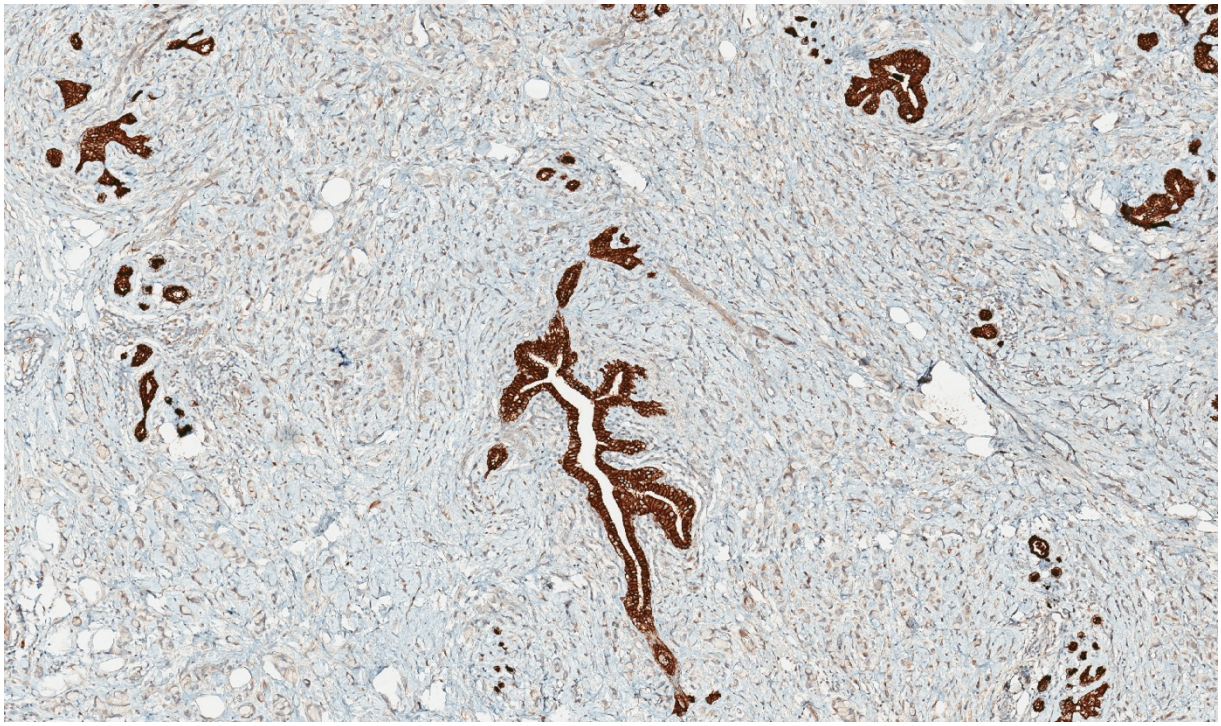
4.3. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ

4.4.1. Örneklerin Kalite Kontrolü

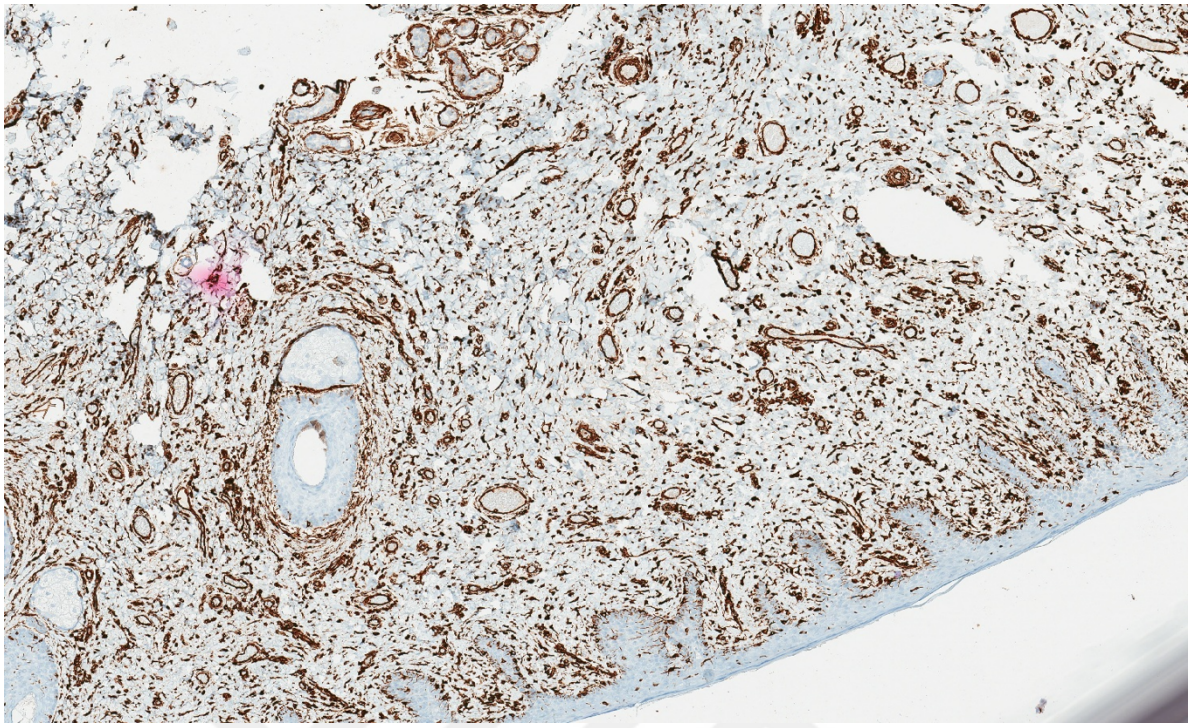
Tez kapsamında 3 farklı antikor kullanılarak over dokularındaki yüzey antijenlerinin gösterilmesi sağlandı. Her antikor için "data sheet"lerinde belirtilen pozitif kontroller ve her bir doku örneği için Thermo (Waltham, Massachusetts, ABD) pozitif şarjlı lam kullanıldı. Her örneğe ait lamın alt kısmına pozitif kontrol doku kesiti alındı. Her antikor için yapılan immunohistokimyasal boyama çalışması için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol dokusuna primer antikor damlatılmadı ve diğer tüm aşamalar standart uygulandı. Kullanılan pozitif kontrollerin mikroskop görüntüleri Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11'de gösterilmiştir. Yapılan mikroskobik incelemelerde pozitif kontrol dokularının DAB kromojen ile kahverengiye boyandığı ve boyama işleminin gerçekleştiği belirlendi. Çalışma dokuları değerlendirilirken öncelikle pozitif kontrolün çalışıp çalışmadığı kontrol edildi, skorlama daha sonra yapıldı.



Şekil 4.9: ZEB1 antikoruna ait pozitif kontrol dokusunun (insan endometriumu) immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüsü.



Şekil 4.10: E-kadherin antikoruna ait pozitif kontrol dokusunun (insan meme kanseri) immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüsü.



Şekil 4.11: Vimentin antikoruna ait pozitif kontrol dokusunun (insan derisi) immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntüsü.

4.4.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

İmmunohistokimyasal boyama yapılmış preparatlar "Nikon Eclipse E200" ışık mikroskobu ile görüntülenip değerlendirildi. Mikroskobik görüntüler dijital görüntüleme sistemi "Aperio ScanScope XD" (Aperio, Vista, CA)'den elde edildi. ZEB1, E-kadherin ve Vimentin için yarı kantitatif puanlama sistemi kullanılarak iki farklı kriter değerlendirildi. Kriterler, boyama alanı yüzdesi ve boyama yoğunluğuydu. Boyama alanı yüzdesi (toplam pozitif hücre sayısı / toplam tümörlü hücre sayısı) x100 formülü ile elde edildi. Veriler 0 (%0), 1 (%1-10), 2 (%10-50), 3 (%51<) olarak puanlandı. Boyama yoğunluğu, DAB kromojenin pozitif hücrelerde oluşturduğu kahverengin tonuna göre belirlendi. Puanlama 0 (negatif, -), 1 (zayıf, +), 2 (orta, ++), 3 (kuvvetli, +++) olarak değerlendirildi. Boyama yoğunluğu ve boyama alan yüzdesi puanlarının toplamı ZEB1, E-kadherin ve Vimentin antikorları için nihai boyama skoru olarak kullanıldı. Tablo 4.9, Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de sırasıyla ZEB1, E-kadherine ve Vimentin antikorlarının immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları gösterilmektedir.

Tablo 4.9: ZEB1 antikorunun immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları.

	SAĞLIKLI OVER DOKULARI			HASTA OVER DOKULARI		
	Boyama Alan Yüzdesi	**Yoğunluk**	**Nihai Skor**	**Boyama Alan Yüzdesi**	**Yoğunluk**	**Nihai Skor**
1	2	1	3	2	1	3
2	2	1	3	3	3	6
3	0	0	0	3	2	5
4	1	1	2	3	3	6
5	0	0	0	3	3	6
6	2	2	4	3	3	6
7	1	1	2	3	3	6
8	1	1	2	3	3	6
9	2	2	4	2	2	4
10	2	2	4	3	2	5
11	2	2	4	3	3	6
12	2	1	3	3	2	5
13	2	1	3	3	2	5
14	2	2	4	3	3	6
15	2	2	4	2	3	5

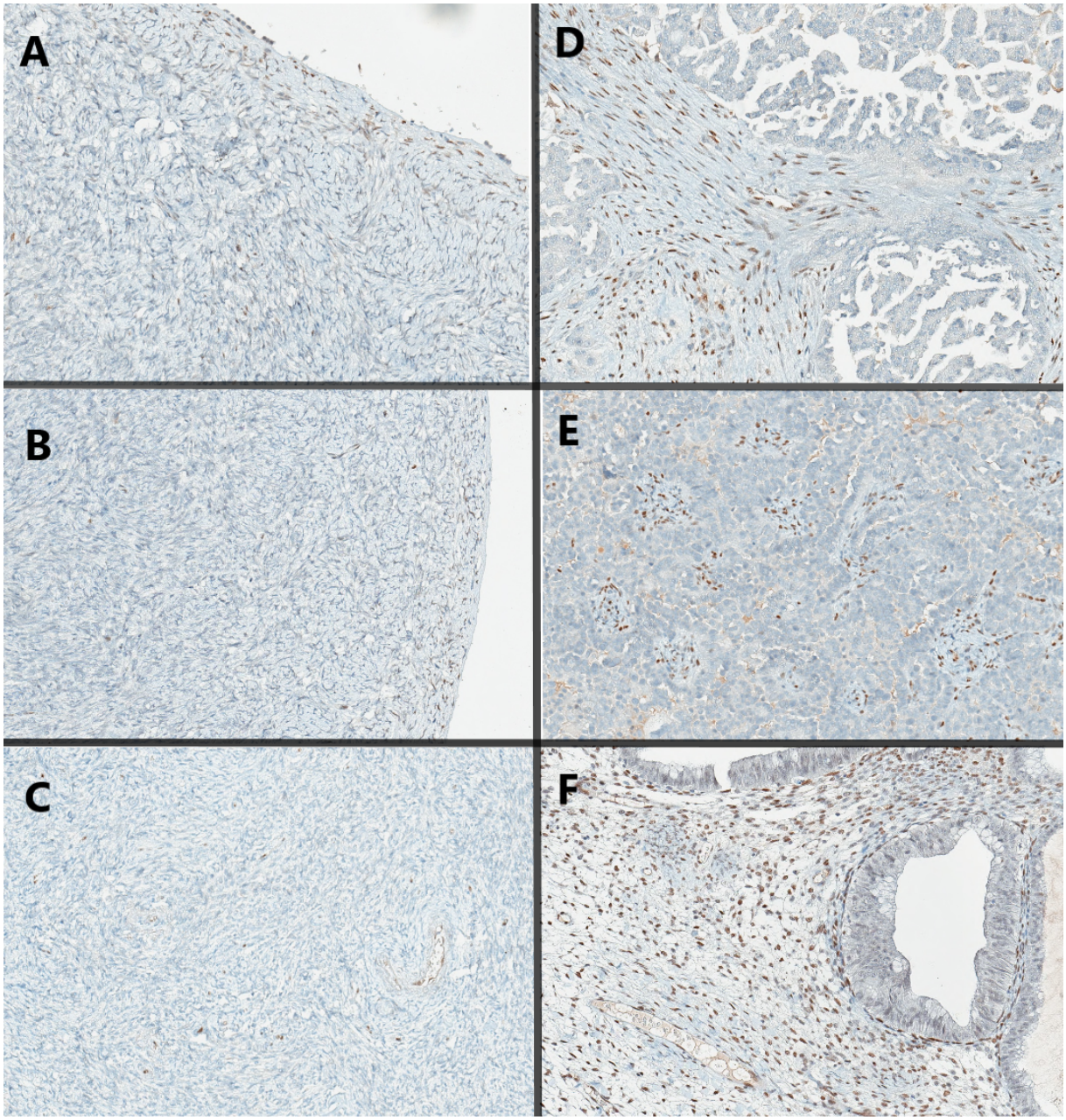
Tablo 4.10: E-kadherin antikorunun immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları.

	SAĞLIKLI OVER DOKULARI			HASTA OVER DOKULARI		
	Boyama Alan Yüzdesi	**Yoğunluk**	**Nihai Skor**	**Boyama Alan Yüzdesi**	**Yoğunluk**	**Nihai Skor**
1	1	1	2	3	3	6
2	3	2	5	3	3	6
3	3	1	4	3	3	6
4	2	2	4	3	3	6
5	1	1	2	2	3	5
6	1	1	2	2	3	5
7	1	1	2	3	3	6
8	2	2	4	2	3	5
9	1	1	2	2	3	5
10	2	1	3	2	3	5
11	2	2	4	2	3	5
12	2	2	4	2	3	5
13	1	2	3	2	3	5
14	2	2	4	2	3	5
15	1	2	3	2	3	5

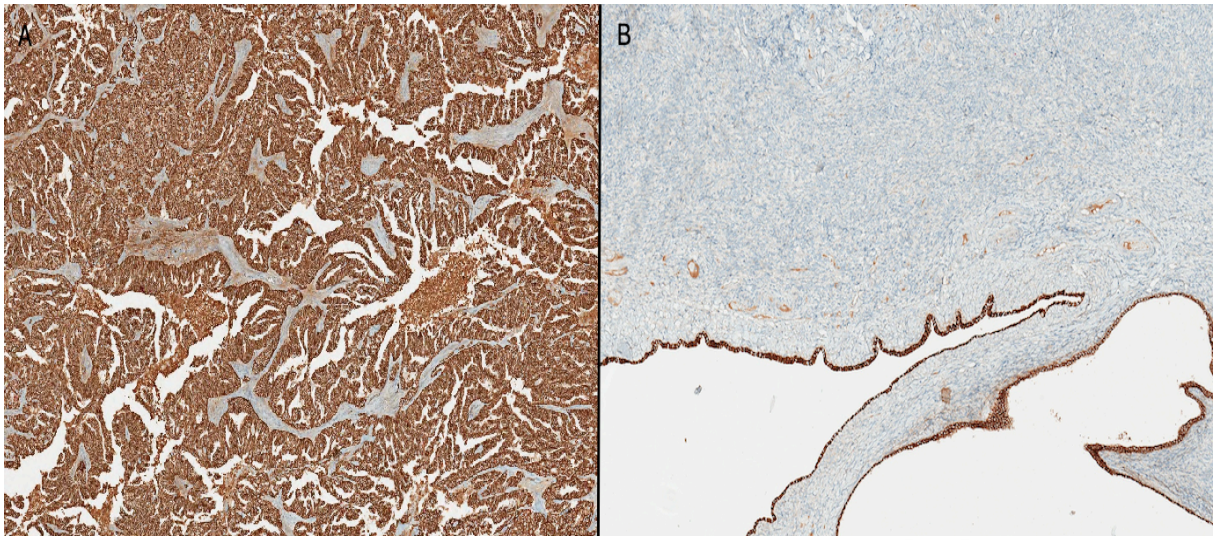
Tablo 4.11: Vimentin antikorunun immunohistokimyasal boyama yarı kantitatif puanlama sonuçları.

	SAĞLIKLI OVER DOKULARI			HASTA OVER DOKULARI		
	Boyama Alan Yüzdesi	**Yoğunluk**	**Nihai Skor**	**Boyama Alan Yüzdesi**	**Yoğunluk**	**Nihai Skor**
1	3	3	6	2	3	5
2	3	3	6	2	2	4
3	3	3	6	2	3	5
4	3	3	6	2	2	4
5	3	3	6	2	2	4
6	3	3	6	2	3	5
7	2	3	5	3	2	5
8	3	3	6	2	2	4
9	2	3	5	2	2	4
10	2	3	5	3	2	5
11	2	3	5	2	2	4
12	3	3	6	2	2	4
13	2	3	5	2	2	4
14	2	3	5	2	2	4
15	2	3	5	3	2	5

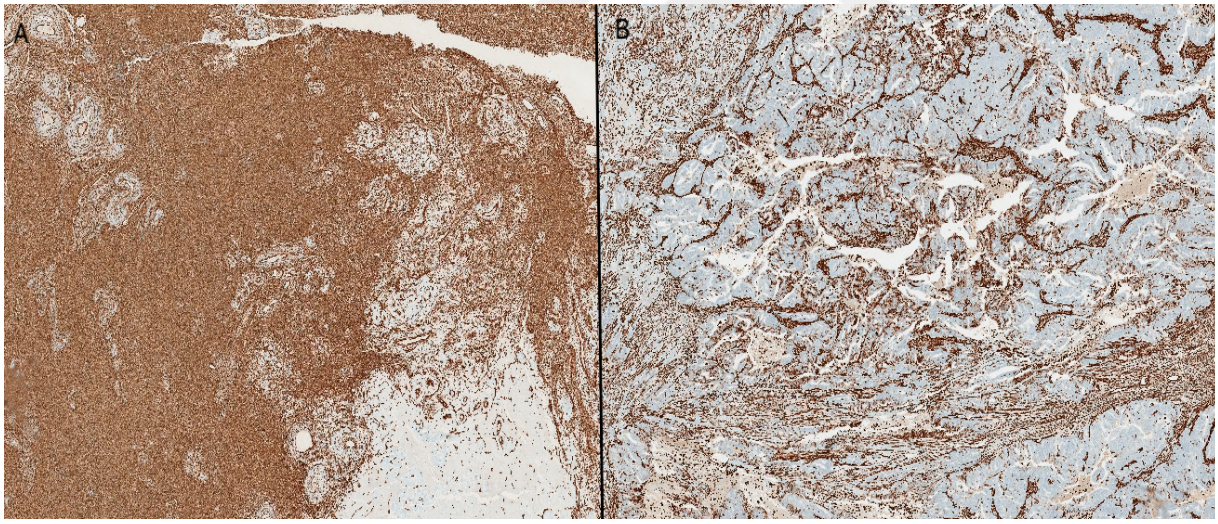
Sağlıklı ve kanserli over dokularında ZEB1, E-kadherin ve Vimentin proteinlerine ait immunohistokimyasal boyama görüntülerinden bazıları sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.



Şekil 4.12: ZEB1 proteinin immunhistokimyasal boyama görüntüleri. ZEB1 proteininin sağlıklı over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örnekleridir (A,B,C). ZEB1 proteininin kanserli over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örnekleridir (D,E,F).



Şekil 4.13: E-kadherin proteinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri. E-kadherin proteininin kanserli over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (A). E-kadherin proteininin sağlıklı over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (B).



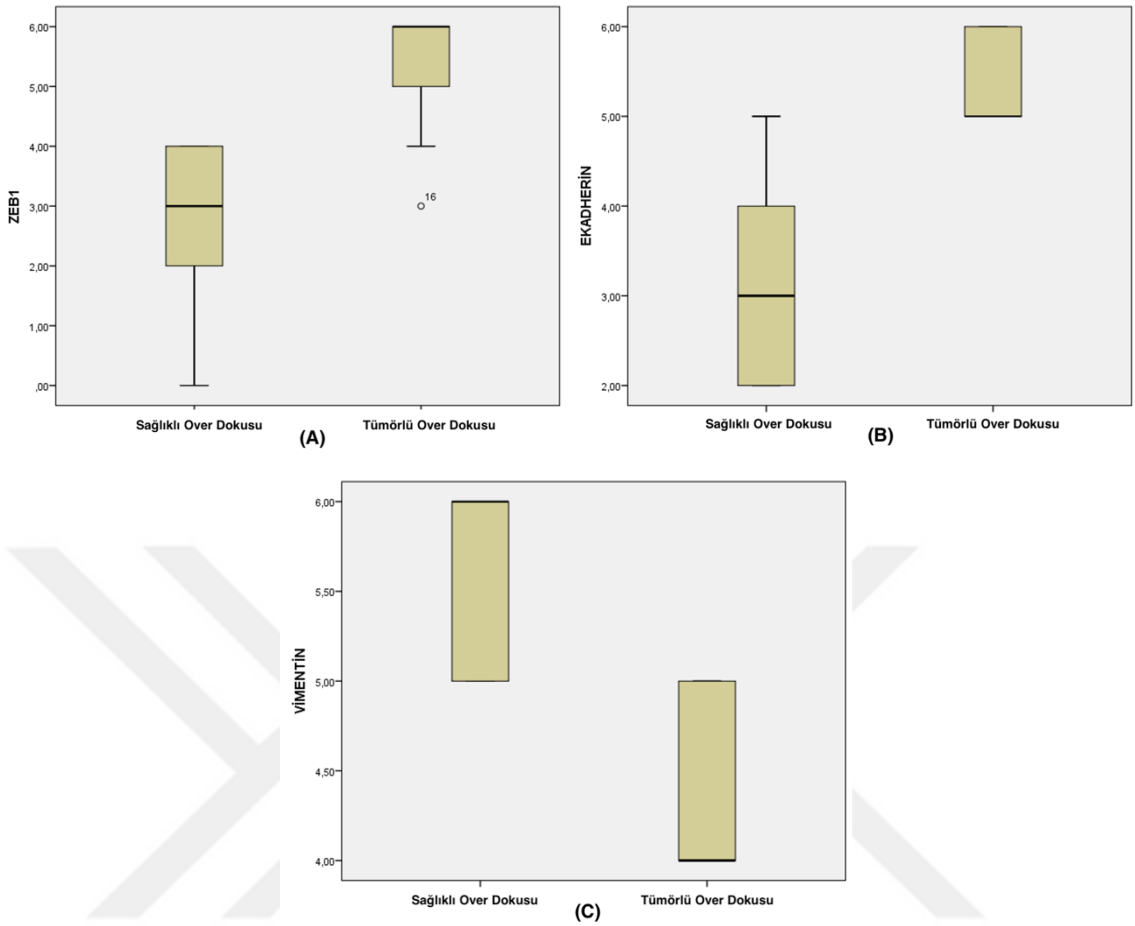
Şekil 4.14: Vimentin proteinin immunohistokimyasal boyama görüntüleri. Vimentin proteininin sağlıklı over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (A). Vimentin proteininin kanserli over dokularına ait immunohistokimyasal boyama örneği (B).

4.4.2. İmmunohistokimyasal İstatistiksel Analiz

Sağlıklı ve over kanserli hastalardaki immunohistokimyasal boyama sonuçları "Mann Whitney U" testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre, ZEB1 proteininin over kanserli hastalardaki miktarı 6 (5-6), sağlıklı bireylerdeki protein miktarına göre 3 (2-4) istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. U= 11; p<0,001. E-kadherin protein miktarını karşılaştırmak için yapılan analiz sonucunda, e-kadherin proteininin over kanserli hastalardaki miktarı 5 (5-6), sağlıklı bireylerdeki protein miktarına göre 3 (2-4) istatistiksel olarak anlamlı artmıştır. U= 5; p<0,001. Dokulardaki vimentin proteininin miktarını karşılaştırmak için yapılan analiz sonucunda, vimentin proteininin over kanserli hastalardaki miktarı 4 (4-5), sağlıklı bireylerdeki protein miktarına göre 6 (5-6) istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır. U= 21; p<0,001. Veri analiz sonuçları Tablo 4.12'de belirtilmiştir. Sonuçların "box plot" grafikleri Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

Tablo 4.12: ZEB1, Vimentin ve E-kadherin proteinlerinin Mann Whitney U testi sonuçları.

PROTEİN ADI	SAĞLIKLI	HASTA	p DEĞERİ
ZEB1	3 (2-4)	6 (5-6)	<0,001
E-kadherin	3 (2-4)	5 (5-6)	<0,001
Vimentin	6 (5-6)	4 (4-5)	<0,001



Şekil 4.15: ZEB1, E-kadherin ve Vimentin proteinlerinin over kanserli ve sağlıklı dokulardaki boyanma miktarlarını gösteren "box plot" grafikleri. Parametrik olmayan veriler "Mann Whitney U" testi ile karşılaştırıldı ve medyan (25 persentil – 75 persentil) olarak ifade edildi. ZEB1 proteininin immunohistokimyasal yöntemle boyanma miktarlarının sağlıklı over dokularında 3(2-4), tümörlü over dokularında 6(5-6) olduğunu gösteren grafik (A). E-kadherin proteininin immunohistokimyasal yöntemle boyanma miktarlarının sağlıklı over dokularında 3(2-4), tümörlü over dokularında 5(5-6) olduğunu gösteren grafik (B). Vimentin proteininin immunohistokimyasal yöntemle boyanma miktarlarının sağlıklı over dokularında 6(5-6), tümörlü over dokularında 4(4-5) olduğunu gösteren grafik (C).

4.5. KORELASYON ANALİZİ

Bu tez kapsamında over kanserinde beş farklı parametrenin birbirleri ile korelasyonu değerlendirildi ve korelasyon katsayıları hesaplandı (Hsa-miR-200c-3p, ZEB1 mRNA, ZEB1 proteini, e-kadherin proteini ve vimentin proteini). Sonuçlar Tablo 4.13'te özetlenmiştir.

Tablo 4.13: Hsa-miR-200c-3p, ZEB1 mRNA, ZEB1 proteini, E-kadherin proteini ve Vimentin proteininin Spearman korelasyon analizi sonuçları.

PARAMETRELER		**ZEB1 mRNA**	**Hsa-miR-200c-3p**	**Vimentin protein**	**E-kadherin protein**	**ZEB1 protein**
ZEB1 mRNA	Korelasyon Katsayısı	1,000	-,752**	,468**	-,661**	-,511**
	P	-	,000	,009	,000	,004
	N	30	22	30	30	30
Hsa-miR-200c-3p	Korelasyon Katsayısı	-,752**	1,000	-,527*	,577**	,533*
	P	,000	-	,012	,005	,011
	N	22	22	22	22	22
Vimentin protein	Korelasyon Katsayısı	,468**	-,527*	1,000	-,560**	-,776**
	P	,009	,012	-	,001	,000
	N	30	22	30	30	30
E-kadherin protein	Korelasyon Katsayısı	-,661**	,577**	-,560**	1,000	,655*
	P	,000	,005	,001	-	,000
	N	30	22	30	30	30
ZEB1 protein	Korelasyon Katsayısı	-,511**	,533*	-,776**	,655*	1,000
	P	,004	,011	,000	,000	-
	N	30	22	30	30	30

**: $p<0,01$

*: $p<0,05$

Korelasyon analizinde ± (0,3 – 0,7) korelasyon katsayısına sahip olan ilişki orta lineer ilişki, ± (0,7 – 1) korelasyon katsayısına sahip olan ilişki güçlü lineer ilişki olarak kabul edildi. Hsa-miR-200c-3p ile ZEB1 mRNA'sı ve ZEB1 proteini ile Vimentin proteini arasında güçlü negatif korelasyon tespit edildi. Diğer parametreler arasındaki korelasyonlar orta derecede ilişkiliydi. Orta pozitif korelasyon gösteren parametreler; ZEB1 mRNA'sı ile vimentin proteini, hsa-miR-200c-3p ile e-kadherin proteini, hsa-miR-200c-3p ile ZEB1 proteini ve e-kadherin proteini ile ZEB1 proteinidir. Orta negatif korelasyon gösteren parametreler ise ZEB1 mRNA'sı ile e-kadherin proteini, ZEB1 mRNA'sı ile ZEB1 proteini, hsa-miR-200c-3p ile vimentin proteini ve vimentin proteini ile e-kadherin proteinidir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Over kanseri dünya çapında, kadınlar arasında kansere bağlı ölümler ve jinekolojik malignitelerin başında gelir [4]. Özellikle 40'lı yaşların ortalarından itibaren over kanseri insidansı artmaktadır. Over kanserli hastalarda, spesifik bir semptomun olmaması kanserin erken dönemde teşhisini zorlaştırmaktadır [178]. Klinikte over kanserinin erken tanısı için duyarlılığı yüksek bir biyobelirtecin bulunmaması araştırmacıları over kanserinin erken tanısı için gen temelli biyobelirteçlerin keşfedilmesine yönlendirmektedir.

MikroRNA'lar, hedeflediği mRNA'ların translasyonunu baskılayarak ya da mRNA'nın degradasyonunu tetikleyerek gen ekspresyonunu düzenleyen, kodlanmayan RNA sınıfını temsil ederler. Yaklaşık 22 nükleotit uzunluğundadırlar [7]. Kanser patogenezinde, hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak işlev görmektedirler. MiRNA'lar karsinogenez, hücre invazyonu, metastaz gibi birçok hücresel yolakta yer alırlar. Over kanserinin erken tanısında ve prognozunun belirlenmesinde miRNA temelli biyobelirteçlerin kullanımı diğer biyobelirteçlere göre daha özgün ve hassas sonuçlar elde edilmesini sağlar [179].

Çalışma grubumuz tarafından EOK'li tümör dokuları ve basit over kisti dokuları mikrodizilim yöntemiyle karşılaştırılarak anlatım farklılığı saptanan aday miRNA'lar tespit edilmiştir (*hsa-miR-4665-3p*; p değeri: 0.0000011 log FC: 4.859524, *hsa-miR-6737-3p*; p değeri: 0.0000602 log FC: 3.851476, ***hsa-miR-200c-3p*; p değeri: 0.0000965 log FC: 7.873392**) [180]. Anlatımı artmış olarak bulunan aday 3 miRNA'nın kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle validasyon çalışması yapılmıştır. EOK'li doku örnekleri ile over kisti doku örneklerinin karşılaştırıldığı çalışmada 3 aday miRNA'nın anlatımlarının arttığı tespit edilmiştir (*hsa-miR-4665-3p*; p değeri: 0.13 log FC: 1.96, *hsa-miR-6737-3p*; p değeri: 0,8457 log FC: 0.17, ***hsa-miR-200c-3p*; p değeri: 0,0273 log FC: 2,87**) [181].

Literatürdeki araştırmaların ve grubumuz tarafından yapılan çalışmalarında sonuçlarının desteklediği hsa-mir-200c-3p'nin özellikle yüksek dereceli seröz over kanseri için spesifik bir biyobelirteç olabileceği öngörüldü. Bu bağlamda, hsa-mir-200c-3p'nin over tümörlerinde metastaz mekanizmasında etkili olduğu ve EMT aracılı kanserin ilerlemesi ile ilgili düzenleme mekanizmasındaki rolü üzerine araştırma planlandı.

Tez kapsamında çalışılan örneklerde homojenizasyonu sağlayabilme adına, hsa-miR-200c-3p'nin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle sağlıklı kadınlara kıyasla anlatım farklılığı konfirme edilmiş ve hsa-miR-200c-3p'nin, EOK'li dokularda sağlıklı over dokularına göre anlatımında 182,35 kat artış bulunmuştur ($p<0.01$). Hsa-miR-200c-3p EOK'li dokuyu sağlıklı dokuya göre 8,35 kat değişimi kesme noktasında %90 duyarlılık ve %100 özgüllük ile ayırt edebilmektedir (AUC: 0.909). Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserinde hedeflediği genleri tespit etmek için "miRDB" ve "KEGG" biyolojik veri tabanları kullanılmıştır.

Hsa-miR-200c-3p, yüksek oranda dizi homolojisi gösteren, miR-200a, miR-200b, miR-429 ve miR-141'in de bulunduğu miR-200 ailesinin bir üyesidir [173, 174]. Yüksek oranda korunmuş dizi homolojileri benzer biyolojik işlevlere sahip olduklarını düşündürmektedir [182]. Hsa-miR-200c-3p, hedeflediği mRNA'ların dizi homolojisi gösteren 3'UTR bölgelerine bağlanarak mRNA translasyonunu inhibe eder [183]. Hsa-miR-200c-3p'nin hedeflediği genler ve katıldığı biyolojik yolaklar Tablo 5.1'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Hsa-miR-200c-3p'nin katıldığı biyolojik yolaklar ve hedeflediği genler.[7]

miRNA	BİYOLOJİK YOLAKLAR	HEDEFLEDİĞİ GENLER
Hsa-miR-200c-3p	Hücre büyümesi ve proliferasyon	FOG2, VEGFR1, SEC23, JAG1, MAM12, MAM13, KRAS, BRD7
	Kemosensitivite	ERFFI-1, TUBB3, KRAS, ZNF217
	Programlı hücre ölümü	FAP-1, PLCG1, TRKB, TBK1, PTEN, P53
	"Epitelyal mezenkimal transizyon"	**ZEB1**, ZEB2, FN1, ZNF217
	Göç ve invazyon	PLCG1, MSN, VEGFR1, CDH1, HMGB1
	Epigenetik düzenleme	DNMTE, DNMT3B, SP1
	Kök hücre	BMI1, JAG1, MAM12, MAM13, Sox2

Züberi ve diğ. [184], miR-200a, miR-200b ve miR-200c anlatımlarının, epitelyal over kanseri ile ilişkisini incelemişlerdir. miR-200a ve miR-200c'nin ileri evre over kanserlerinde

[7] http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR200C.html [Ziyaret tarihi: 3 Mart 2021].

anlatımlarının artmış olduğunu ve lenf nodu metastazı olan tüm hastalarda miR-200c'nin anlatımının değiştiğini göstermişlerdir.

Wang ve diğ. [185], over kanserli ve sağlıklı serum örnekleriyle 5 farklı miRNA'nın (miR-127, miR-143, miR-200c, miR-205, miR-346) anlatım farklılıklarını karşılaştırarak, miR-127, miR-200c ve miR-346'nın tümör evresi ve uzak metastazla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. MiR-127, miR-143, miR-200c, miR-205 ve miR-346'nın EOK'inde prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Meng ve diğ. [186], EOK'li hastaların serum örnekleri ve benign karakterli over tümörü hastalardan elde ettikleri serum örneklerini karşılaştırmışlardır. MiR-373, miR-200a, miR-200b ve miR-200c'nin EOK'li hastalarda, sağlıklı kadınlara göre anlatımlarının arttığını tespit etmişlerdir. Bulgular, çalışmada yer alan miRNA'ların over kanserinin progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Literatür çalışmaları, hsa-miR-200c-3p ile gerçekleştirdiğimiz anlatım analizi sonuçlarımızı desteklemektedir. Hsa-miR-200c-3p'nin over kanserinde tümör progresyonu ile ilişkili olabileceğini ve yapılacak destekleyici çalışmalarla over kanserinin erken tanısı için yeni bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Biyolojik veri tabanları "miRDB" ve "KEGG" analizleri kullanılarak hsa-miR-200c-3p'nin "epitelyal mezenkimal transizyon" yolağında yer aldığını ve bu yolaktaki hedef genlerinden birinin ZEB1 "Zinc Finger E-Box Binding Homeobox" olduğunu tespit ettik. EMT yolağının araştırılması over kanserinin metastaz mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olabilir. Tez kapsamında ZEB1 geninin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle kanserli ve sağlıklı over dokularındaki gen anlatım analizleri karşılaştırılmıştır. ZEB1 geninin over kanserli dokulardaki anlatımının, sağlıklı dokulara göre 0,3 kat azaldığı bulunmuştur ($p<0,01$). ZEB1 geni EOK'li dokuyu sağlıklı dokuya göre 0,825 kat değişimi kesme noktasında %93 duyarlılık ve %100 özgüllük ile ayırt edebilmektedir (AUC: 0.933). EMT'nin, epitelyal hücreden mezenkimal hücreye dönüşüm süreci olduğunu ve mezenkimal hücre özelliklerini alan hücrelerinde daha hareketli, istilacı ve apoptoza karşı dirençli hücreler haline geldiğini tanımlamıştık. Hsa-mir-200c-3p 'nin hedeflerinden biri olan ZEB1 "Zinc Finger E-Box Binding Homeobox", hücresel transformasyonu düzenlemede görev alarak kanser gelişimi ve ilerlemesinde EMT'yi bir adhezyon molekülü olan e-kaderini baskılayarak düzenler [187]. CDH1 "cadherin 1" geni tarafından anlatımı yapılan e-kadherin, hücrede kimyasal sinyal iletiminde, hücre olgunlaşmasında ve hücresel hareketi düzenlemede görevli genlerin

aktivitesini kontrol eder. ZEB1, E-kaderin promotörü içindeki E-kutularına bağlanır ve E-kaderinin anlatımını durdurur [174]. ZEB1, E-kadherin aracılığı ile EMT'de görev almış olur. Çalışmamızda tespit ettiğimiz gibi hsa-miR-200c-3p'nin, ZEB1 hedefleyerek anlatımını baskılaması sonucunda E-kadherin yeterince baskılanmadığı için EMT de bir artış olur.

EMT'de görevli bir transkripsiyon faktörü olan ZEB1 epitel hücrelerinin transkripsiyonel baskılayıcısıdır [188]. Hsa-miR-200c-3p, ZEB1'in 3'UTR'sindeki yüksek oranda korunmuş bölgelerine bağlanarak, ZEB1 ekspresyonunu transkripsiyon sonrası seviyede inhibe etmektedir. Hsa-miR-200c-3p, kromozom 12'de (12p13.31) konumlanmıştır. "steem loop" dizilerinin 600 baz çifti yukarısında yer alan promotör bölgelerinde ZEB1 için altı farklı bağlanma dizisi içerir. ZEB1 ise hücrede artan hsa-miR-200c-3p konsantrasyonunu dengede tutmak için hsa-miR-200c-3p'nin hedef dizilerine bağlanarak hsa-miR-200c-3p ekspresyonunu baskılamaktadır. Hsa-miR-200c-3p ve ZEB1 arasında negatif ve çift yönlü geri bildirim mekanizması olduğu düşünülmektedir [20].

Bendoraite ve diğ. [167], ileri evredeki EOK hasta dokularıyla yaptıkları çalışmada miR-200c-3p anlatımının kanserli dokularda arttığını ve miR-200c-3p'nin EMT'deki hedef mRNA'ları olan ZEB1 ve ZEB2'nin gen anlatımlarının azaldığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri verilerle ZEB2'ninde, ZEB1 gibi miR-200 ailesi üyeleriyle negatif ve çift yönlü geri bildirim mekanizmasına sahip olduğunu göstermişlerdir. Korpal ve diğ. [189], miR-200 ailesi üyelerinin, EMT sırasında ZEB1 ve ZEB2 tarafından e-kadherinin baskılanmasında önemli bir rol oynayabileceğini ifade etmişler ve kanserin progresyonu sırasında göç ve invazyonu arttırabileceğini öne sürmüşlerdir. Park ve diğ. [21], miR-200 ailesinin e-kadherin transkripsiyonel baskılayıcıları ZEB1 ve ZEB2'nin mRNA'sını doğrudan hedeflediklerini tespit etmişler ve miR-200 ekspresyonunun hücre hareketliliğini azalttığını bildirmişlerdir. Ek olarak miR-200 ailesini vimentin negatif, e-kadherin pozitif over kanserli hücrelerde biyobelirteç olarak tanımlamışlardır. Sonuçlarımız, ZEB1'in gen anlatımının miR-200 ailesi tarafından baskılandığını gösteren literatür çalışmalarını desteklemektedir.

Çalışmamızda, sonuçlarımızı desteklemek amacıyla sağlıklı ve over kanserli dokulardaki ZEB1 protein miktarı immunohistokimyasal boyama yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Boyama sonuçlarına göre over kanserli dokularda [6 (5-6)], sağlıklı dokulara [3 (2-4)] göre, ZEB1 protein miktarının arttığı tespit edilmiştir ($U=11$, $p<0,001$). İmmunohistokimyasal boyama analizinden elde edilen verilerimiz, ZEB1 mRNA ekspresyon verileri ile karşılaştırıldığında

sonuçlarımızın negatif yönde korele olduğu görülmüştür (Korelasyon katsayısı: -0,752). Literatürde mRNA seviyesi ve protein seviyesi arasındaki negatif korelasyonun çeşitli sebepleri olduğu belirtilmektedir [190]. mRNA'dan protein sentezlenmesinde yeterince açıklığa kavuşmamış transkripsiyon sonrası mekanizmalar negatif korelasyonun en olası sebebi olarak gösterilmektedir. Proteinlerin "in vivo" yarı ömürlerinde önemli farklılıklar gösterebilmesi ve mRNA ile protein deneylerinde net sonuçlar elde etmemizi sınırlayan hataların bulunması diğer sebepler olarak gösterilmektedir [190]. Ek olarak, ZEB1 mRNA'sının çok sayıda varyantının bulunması ve immunohistokimyasal boyama aşamasında kullanılan antikorun poliklonal özellikte olması negatif korelasyonun nedenleri arasında düşünülebilir.

EMT; hücreler arası sıkı bağlantı ve kuvvetli apikal bazal polariteye sahip epitelyal hücrelerin özelliklerini kaybederek göç ve invazyon yeteneği kazanan mezenkimal hücrelere dönüşüm süreci olarak tanımlanmaktadır. EMT süreci ZEB, TWIST ve SNAIL ailesi transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir. EMT, ZEB1'in negatif düzenleyicisi olan e-kadherinin azalmış anlatımı ile karakterizedir [167, 191].

E-kadherin, hücrelerin birbiriyle yapışmasını sağlayacak şekilde yerleşim gösteren ve çevre hücreler arasındaki bağlantıların kurulmasından sorumlu transmembran proteindir [192]. E-kadherin, hsa-miR-200c-3p'nin göç ve invazyon yolağında yer almakta ve CDH1 geni tarafından kodlanmaktadır. İmmunohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak, sağlıklı ve over kanserli dokulardaki e-kadherin boyanma miktarı karşılaştırılmıştır. Over kanserli hastalarda [5 (5-6)], sağlıklı kadınlara [3 (2-4)] göre e-kadherin boyanma miktarının arttığı tespit edilmiştir ($U=5$, $p<0,001$). EMT sürecindeki e-kadherin kaybının aksine, ileri evre over kanserli dokularda e-kadherin boyanma miktarının artması over karsinogenezinde mezenkimalden epitele doğru bir geçiş sürecinin olduğunu düşündürebilir ve over yüzey epitelinin anormal epitel farklılaşmasında tetikleyici bir etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Epitelyal tümörler, kanser ilerledikçe hücrelerin daha hareketli hale dönüşebilmeleri için e-kadherin ekspresyonu azalır. Hücrelerdeki, e-kadherin kaybı epitelden mezenkimale geçişteki önemli bir belirteçtir [193]. Over kanserinde bu sürecin farklı olduğu iddia edilmektedir. Sağlıklı dokularda e-kadherin pozitif hücreler az iken, kanserli dokularda e-kadherin pozitif hücrelerin fazla olduğu düşünülmektedir [194, 195]. CDH1 geni tarafından anlatımı yapılan e-kadherinin Faleiro-Rodrigeus ve diğ. [194] ver kanserli dokularda over kanserinin farklı evrelerindeki hastalarla yaptıkları çalışmada pozitif boyanma gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yoshida ve diğ. [196], sağlıklı bireylerdeki over yüzey epitelinde e-kadherin pozitifliğinin gözlenmediğini, benign tümörlerden karsinomlara doğru gidildikçe SNAIL ve TWIST transkripsiyon faktörlerinin gen anlatımlarının azalmasıyla birlikte, e-kadherin pozitifliğinin arttığını ifade etmişlerdir. SNAIL ve TWIST ailesi, hücre çoğalımı ve sağ kalımı, tümör nüksü, EMT gibi yolaklarda görev alırlar. EMT'nin transkripsiyon faktörleridir. SNAIL ve TWIST ailesi kanser gelişimi ve ilerlemesinde EMT'yi bir adhezyon molekülü olan e-kadherini baskılayarak düzenler. E-kadherin hücresel hareketleri kontrol etmede görevli olan genleri düzenleyen EMT'deki epitelyal belirteçtir. TWIST ve SNAIL aileleri, CDH1 geni tarafından kodlanan e-kadherin promotörü içerisindeki E-kutulara bağlanır ve e-kadherinin anlatımını durdurur [197]. Epitelyal fenotipin baskın olduğu EOK'inde e-kadherin'in artan anlatımı, TWIST ve SNAIL transkripsiyon faktörlerinin anlatımındaki azalmaya sebep olur. Veriler; EMT'de rol alan genlerde (SNAIL, TWIST, e-kadherin) yaşanan gen anlatımı değişikliklerinin EOK'nin gelişiminde mezenkimalden epitele geçiş mekanizmasının etkili olabileceğini düşündürmektedir. Verilerimiz over kanserinin gelişim süreciyle ilgili literatür çalışmalarıyla uyumludur. E-kadherinin over kanserini erken evrede tanımlayabilecek bir biyobelirteç ve over kanseri tedavisinde önemli bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Vimentin geni tarafından üretilen vimentin, mezenkimal hücrelerde yüksek miktarda anlatımı yapılan tip III filament proteinidir. Özellikle fibroblastlar ve düz kas hücreleri gibi mezenkimal kökenli hücrelerde bulunur [198]. EMT'nin mezenkimal biyobelirtecidir. Tez kapsamında vimentin proteininin sağlıklı ve kanserli over dokularındaki pozitifliği immunohistokimyasal boyama yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Vimentin proteininin tümörlü over dokularında [4 (4-5)], sağlıklılara [6 (5-6)] göre zayıf boyanma paterni gösterdiği tespit edilmiştir ($U=21$, $p<0,001$). Huo ve diğ. [199], ilaca dirençli over kanserlerinde vimentin ekspresyonunun azaldığını ileri sürmüşlerdir. Vimentin yıkımının, hücrelere kök hücre özelliği kazandırdığı ve hücrelerin uzun süre G2 fazında kalarak ilaç direnci geliştirmelerine sebep olduklarını ifade etmişlerdir. Vimentin, ilaç dirençli over kanserlerini tedavi etme amacıyla kullanılan terapötik bir hedef olabilir.

Sun ve diğ. [200], miR-506'yı EMT ve metastazda yeni bir biyobelirteç olarak tanımlamışlardır. MiR-506'nın vimentin ve bir diğer mezenkimal biyobelirteç olan n-kadherini baskıladığını, e-kadherin anlatımını tetiklediğini ifade etmişlerdir. EOK'nin tüm alt tiplerinde

vimentin ve e-kadherin arasında negatif korelasyon tespit etmişlerdir. E-kadherin ve vimentin arasındaki negatif korelasyon, çalışmamızdaki bulgularla uyumluluk göstermektedir.

Verilerimiz, over karsinogenezinde epitelden mezenkimale olan geçiş sürecinin aksine mezenkimalden epitele geçiş modelini desteklemektedir [201]. Sağlıklı dokulara kıyasla kanserli dokularda anlatımı artan hsa-miR-200c-3p ve kuvvetli e-kadherin pozitifliğine ek olarak ZEB1'in azalan gen anlatımı ve vimentinin azalan boyama paterni mezenkimalden epitele geçiş süreci ile uyumludur. Over yüzeyi, periton boşluğunun mezenkimal hattı ile süreklilik gösterir. Over yüzeyinin histolojik yapısında hem epitelyal hem de mezenkimal fenotip sergileyen hücreler bulunmaktadır. Over yüzeyi, e-kadherin ve müsin gibi epitelyal belirteçlerin yanı sıra vimentin ve n-kadherin gibi mezenkimal belirteçleri de içermektedir [22]. Over kanserinin, over yüzey epitelinden kaynaklandığı hipotezi, yüzey epitel hücrelerinin mezenkimalden epitele geçiş yapması ile desteklenebilir. Tez kapsamında elde ettiğimiz polimeraz zincir reaksiyonu ve immunohistokimyasal boyama sonuçları, mezenkimalden epitele geçiş modelini desteklemektedir. E-kadherin geninin anlatımındaki farklılıkların, hsa-miR-200c-3p anlatımı ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir. MiR-200 ailesi üyelerinden biri olan hsa-miR-200c-3p'nin, ZEB1'in gen anlatımını baskılayarak, over kanserinde e-kadherin anlatımının tetiklenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Kanserin ileri evrelerinde diğer epitelyal kanserlerde olduğu gibi epitelden mezenkimale geçiş söz konusu olabilir. Tümör hücreleri, epitel özelliklerini ya da moleküler belirteçlerini kaybetmeden ve mezenkimal hücrelere ait genlerin ekspresyonunu tetiklemeden invaziv ya da metastatik özellik kazanabilirler. Bu sebeple EMT ya da MET terimlerini metastaz ile açıklamak her zaman uygun olmayabilir [192].

Tez kapsamında elde edilen verilerde, over kanserli dokularda sağlıklı dokulara göre epitelyal karakterlerin arttığı mezenkimal karakterlerin azaldığı gösterilmiştir. Fakat hasta örnek sayısının kısıtlı olması ve örneklerin %87'sinin ileri evre over kanserli dokulardan oluşması, evreler arası geçişlerdeki gen anlatım farklılıklarını göstermemize engel olmuş olabilir. Çalışmayı geliştirici ve destekleyici nitelikte olabilecek ileriki projelerde over kanserinin her evresini içeren çok sayıda hasta örneği ile çalışmak over karsinogenez sürecini aydınlatmaya yardımcı olabilir.

Sonuçlarımız, miR-200 ailesi üyelerinden biri olan hsa-miR-200c-3p'nin, hedef geni ZEB1'in promotör bölgesine bağlanarak gen anlatımını baskıladığı hipotezini desteklemektedir.

Hücredeki miktarı azalan ZEB1 proteini, e-kadherini kodlayan CDH1geninin protomörüne yeterince bağlanamaz ve e-kadherin protein miktarında artış meydana gelir. Verilerimiz hsa-miR-200c-3p, ZEB1 ve CDH1 arasındaki moleküler mekanizmayı destekleyici niteliktedir. Over kanserli dokularda, epitelyal biyobelirteç olan e-kadherin proteininin artan miktarı ve mezenkimal biyobelirteç olan vimentin proteininin azalan miktarı over karsinogenezinin mezenkimalden epitele geçiş modeli ile uyumlu olabileceğini göstermektedir. Hsa-miR-200c-3p'nin over karsinogenezinde rol aldığını ve epitelyal over kanserinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip yeni bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

[1]. Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., Ledermann, J. A., 2014, Ovarian cancer, *The lancet*, 384(9951), 1376-1388.

[2]. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

[3]. Sankaranarayanan, R., Ferlay, J., 2006, Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem, *Best practice & research clinical obstetrics & gynaecology*, 20(2), 207-225.

[4]. Cho, K. R., Shih, I.M., 2009, Ovarian cancer, *Annual review of pathology: mechanisms of disease*, 4, 287-313.

[5]. Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., Hauptmann, S., Sehouli, J., 2015, Statement by the Kommission Ovar of the AGO: the new FIGO and WHO classifications of ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer, *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 75(10), 1021.

[6]. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., Nieto, M. A., 2009, Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease, *Cell*, 139(5), 871-890.

[7]. Lee, R. C., Ambros, V., 2001, An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans, *Science*, 294(5543), 862-864.

[8]. Bartel, D. P., 2009, MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 136(2), 215-233.

[9]. Mattiske, S., Suetani, R. J., Neilsen, P. M., Callen, D. F., 2012, The Oncogenic Role of miR-155 in Breast Cancer, *Cancer epidemiology biomarkers prevention*, 21(8), 1236-1243.

[10]. Asangani, I. A., Rasheed, S. A., Nikolova, D., Leupold, J., Colburn, N., Post, S., Allgayer, H., 2008, MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer, *Oncogene*, 27(15), 2128-2136.

[11]. Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., 2008, The miR-15a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities, *Nature medicine*, 14(11), 1271-1277.

[12]. Lee, Y. S., Dutta, A., 2007, The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene, *Genes & development*, 21(9), 1025-1030.

[13]. Liu, Y.N., Lee, W.W., Wang, C.Y., Chao, T.H., Chen, Y., Chen, J. H., 2005, Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression, *Oncogene*, 24(56), 8277-8290.

[14]. Angst, B. D., Marcozzi, C., Magee, A. I., 2001, The cadherin superfamily: diversity in form and function, *Journal of cell science*, 114(4), 629-641.

[15]. Huber, O., Bierkamp, C., Kemler, R., 1996, Cadherins and catenins in development, *Current opinion in cell biology*, 8(5), 685-691.

[16]. Jeanes, A., Gottardi, C., Yap, A., 2008, Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?, *Oncogene*, 27(55), 6920-6929.

[17]. Fletcher, D. A., Mullins, R. D., 2010, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature*, 463(7280), 485-492.

[18]. Satelli, A., Li, S., 2011, Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cellular and molecular life sciences*, 68(18), 3033-3046.

[19]. Goldie, K. N., Wedig, T., Mitra, A. K., Aebi, U., Herrmann, H., Hoenger, A., 2007, Dissecting the 3-D structure of vimentin intermediate filaments by cryo-electron tomography, *Journal of structural biology*, 158(3), 378-385.

[20]. Burk, U., Schubert, J., Wellner, U., Schmalhofer, O., Vincan, E., Spaderna, S., Brabletz, T., 2008, A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells, *EMBO reports*, 9(6), 582-589.

[21]. Park, S.-M., Gaur, A. B., Lengyel, E., Peter, M. E., 2008, The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2, *Genes & development*, 22(7), 894-907.

[22]. Clement, P. B., 1987, Blaustein's pathology of the female genital tract, Anatomy and histology of the ovary, *Springer*, 438-470.

[23]. Weidner, N., Cote, R. J., Suster, S., Weiss, L. M., 2009, Modern Surgical Pathology E-Book, Elsevier health sciences, ISBN: 9781437719581.

[24]. Pawlina, W., Ross, M. H., 2018, Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 1496386248.

[25]. Webb, P. M., Jordan, S. J., 2017, Epidemiology of epithelial ovarian cancer, *Best Practice research clinical obstetrics gynaecology*, 41, 3-14.

[26]. Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A., 2019, Cancer statistics, 2019, *CA: A cancer journal for Clinicians*, 69(1), 7-34.

[27]. Odicino, F., Pecorelli, S., Zigliani, L., Creasman, W. T., 2008, History of the FIGO cancer staging system, *International journal of gynaecology obstetrics*, 101(2), 205-10.

[28]. Prat, J., 2014, Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum, *International journal of gynaecology obstetrics*, 124(1), 1-5.

[29]. Carcangiu, M., Kurman, R. J., Carcangiu, M. L., Herrington, C. S., 2014, WHO classification of tumours of female reproductive organs, International agency for research on cancer, ISBN: 9283224353.

[30]. Berek, J. S., Crum, C., Friedlander, M., 2015, Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum, *International journal of gynaecology obstetrics* 131 Suppl 2, S111-22.

[31]. Berek, J. S., Kehoe, S. T., Kumar, L., Friedlander, M., 2018, Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum, *International journal of gynaecology obstetrics*, 143(2), 59-78.

[32]. Kanzow, M., Van Mackelenbergh, M., Maass, N., Bauerschlag, D., 2018, Diagnostik und Therapie des Ovarialkarzinoms, *Der Onkologe*, 24(4), 343-356.

[33]. Abraham, J., 2010, OVA1 test for preoperative assessment of ovarian cancer, *Community Oncology*, 6(7), 249-250.

[34]. Chudecka-Głaz, A. M., 2015, ROMA, an algorithm for ovarian cancer, *Clinica Chimica Acta*, 440, 143-151.

[35]. Orr, B., Edwards, R. P., 2018, Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer, *Hematology/oncology clinics of north america*, 32(6), 943-964.

[36]. Sueblinvong, T., Carney, M. E., 2009, Current understanding of risk factors for ovarian cancer, *Current treatment options Oncology*, 10(1-2), 67-81.

[37]. Whiteman, D. C., Siskind, V., Purdie, D. M., Green, A. L. C., 2003, Timing of Pregnancy and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer, *American association for cancer research*, 12, 42-46.

[38]. Danforth, K. N., Tworoger, S. S., Hecht, J. L., Rosner, B. A., Colditz, G. A., Hankinson, S. E., 2007, Breastfeeding and risk of ovarian cancer in two prospective cohorts, *Cancer causes control*, 18(5), 517-23.

[39]. Jordan, S. J., Webb, P. M., Green, A. C., 2005, Height, Age at Menarche, and Risk of Epithelial Ovarian Cancer, *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*, 14(8), 2045-2048.

[40]. Gong, T. T., Wu, Q. J., Vogtmann, E., Lin, B., Wang, Y. L., 2013, Age at menarche and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of epidemiological studies, *International journal cancer*, 132(12), 2894-900.

[41]. Obata, K., Hoshiai, H., 2000, Common Genetic Changes between Endometriosis and Ovarian Cancer, *Gynecologic and obstetric investigation*, 50, 39-43.

[42]. Bas-Esteve, E., Pérez-Arguedas, M., Guarda-Muratori, G. A., Acién, M., Acién, P., 2019, Endometriosis and ovarian cancer: Their association and relationship, *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology: X*, 3, 100053.

[43]. Ness, R. B., 2003, Endometriosis and ovarian cancer: Thoughts on shared pathophysiology, *American journal of obstetrics and gynecology*, 189(1), 280-294.

[44]. Barry, J. A., Azizia, M. M., Hardiman, P. J., 2014, Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis, *Human reproduction update*, 20(5), 748-758.

[45]. Mclemore, M. R., Miaskowski, C., Aouizerat, B. E., Chen, L.-M., Dodd, M. J., 2009, Epidemiologic and genetic factors associated with ovarian cancer, *Cancer nursing*, 32(4), 281.

[46]. Nelson, H. D., Huffman, L. H., Fu, R., Harris, E. L., 2005, Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the US Preventive Services Task Force, *Annals of internal medicine*, 143(5), 362-379.

[47]. Taylor, N., Mutch, D. G., 2006, Gynecologic manifestations of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. From inherited to sporadic disease, *Oncology (Williston Park, NY)*, 20(1), 85-94; discussion 94.

[48]. Schmeler, K. M., Lynch, H. T., Chen, L.M., Munsell, M. F., Soliman, P. T., Clark, M. B., Daniels, M. S., White, K. G., Boyd-Rogers, S. G., Conrad, P. G., 2006, Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome, *New England journal of medicine*, 354(3), 261-269.

[49]. Baxter, S., Thomas, E., Campbell, I., 2001, GSTM1 null polymorphism and susceptibility to endometriosis and ovarian cancer, *Carcinogenesis*, 22(1), 63-66.

[50]. Ramus, S. J., Song, H., Dicks, E., Tyrer, J. P., Rosenthal, A. N., Intermaggio, M. P., Fraser, L., Gentry-Maharaj, A., Hayward, J., Philpott, S., 2015, Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer, *Journal of the national cancer institute*, 107(11).

[51]. Rafnar, T., Gudbjartsson, D. F., Sulem, P., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Besenbacher, S., Lundin, P., Stacey, S. N., Gudmundsson, J., 2011, Mutations in BRIP1 confer high risk of ovarian cancer, *Nature genetics*, 43(11), 1104-1107.

[52]. Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., Myers, A. E., 2016, Diagnosis and Management of Ovarian Cancer, *American academy of family physician*, 93(11), 937-44.

[53]. Yang, X.Q., Yan, L., Chen, C., Hou, J. X., Li, Y., 2009, Application of C12 multi-tumor marker protein chip in the diagnosis of gastrointestinal cancer: results of 329 surgical

patients and suggestions for improvement, *Hepato-gastroenterology*, 56(94-95), 1388-1394.

[54]. Dieplinger, H., Ankerst, D. P., Burges, A., Lenhard, M., Lingenhel, A., Fineder, L., Buchner, H., Stieber, P., 2009, Afamin and apolipoprotein A-IV: novel protein markers for ovarian cancer, *Cancer epidemiology and prevention biomarkers*, 18(4), 1127-1133.

[55]. Moore, R. G., Maclaughlan, S., 2010, Current clinical use of biomarkers for epithelial ovarian cancer, *Current opinion in oncology*, 22(5), 492-497.

[56]. Zhang, B., Cai, F. F., Zhong, X. Y., 2011, An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis, *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology*, 158(2), 119-123.

[57]. Russo, A., Calò, V., Bruno, L., Rizzo, S., Bazan, V., Di Fede, G., 2009, Hereditary ovarian cancer, *Critical reviews in oncology/hematology*, 69(1), 28-44.

[58]. Prat, J., Ribé, A., Gallardo, A., 2005, Hereditary ovarian cancer, *Human pathology*, 36(8), 861-870.

[59]. Gayther, S. A., Mangion, J., Russell, P., Seal, S., Barfoot, R., Ponder, B. A., Stratton, M. R., Easton, D., 1997, Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene, *Nature genetics*, 15(1), 103-105.

[60]. Peters, D. G., Kudla, D. M., Deloia, J. A., Chu, T. J., Fairfull, L., Edwards, R. P., Ferrell, R. E., 2005, Comparative gene expression analysis of ovarian carcinoma and normal ovarian epithelium by serial analysis of gene expression, *Cancer epidemiology and prevention biomarkers*, 14(7), 1717-1723.

[61]. Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., 1995, Serial analysis of gene expression, *Science*, 270(5235), 484-487.

[62]. Hough, C. D., Sherman-Baust, C. A., Pizer, E. S., Montz, F., Im, D. D., Rosenshein, N. B., Cho, K. R., Riggins, G. J., Morin, P. J., 2000, Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer, *Cancer research*, 60(22), 6281-6287.

[63]. Rangel, L. B., Sherman-Baust, C. A., Wernyj, R. P., Schwartz, D. R., Cho, K. R., Morin, P. J., 2003, Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression, *Oncogene*, 22(46), 7225-7232.

[64]. Esteller, M., 2008, Epigenetics in cancer, *New England journal of medicine*, 358(11), 1148-1159.

[65]. Barton, C. A., Hacker, N. F., Clark, S. J., O'brien, P. M., 2008, DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment, *Gynecologic oncology*, 109(1), 129-139.

[66]. De Caceres, I. I., Battagli, C., Esteller, M., Herman, J. G., Dulaimi, E., Edelson, M. I., Bergman, C., Ehya, H., Eisenberg, B. L., Cairns, P., 2004, Tumor cell-specific BRCA1 and RASSF1A hypermethylation in serum, plasma, and peritoneal fluid from ovarian cancer patients, *Cancer research*, 64(18), 6476-6481.

[67]. Sellar, G. C., Watt, K. P., Rabiasz, G. J., Stronach, E. A., Li, L., Miller, E. P., Massie, C. E., Miller, J., Contreras-Moreira, B., Scott, D., 2003, OPCML at 11q25 is epigenetically inactivated and has tumor-suppressor function in epithelial ovarian cancer, *Nature genetics*, 34(3), 337-343.

[68]. Yu, Y., Fujii, S., Yuan, J., Luo, R. Z., Wang, L., Bao, J., Kadota, M., Oshimura, M., Dent, S. R., Issa, J. P., 2003, Epigenetic regulation of ARHI in breast and ovarian cancer cells, *Annals of the New York academy of sciences*, 983(1), 268-277.

[69]. Kwong, J., Lee, J.Y., Wong, K.-K., Zhou, X., Wong, D. T., Lo, K.W., Welch, W. R., Berkowitz, R. S., Mok, S. C., 2006, Candidate tumor-suppressor gene DLEC1 is frequently downregulated by promoter hypermethylation and histone hypoacetylation in human epithelial ovarian cancer, *Neoplasia*, 8(4), 268-278.

[70]. Wilcox, C. B., Baysal, B. E., Gallion, H. H., Strange, M. A., Deloia, J. A., 2005, High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors, *Cancer genetics and cytogenetics*, 159(2), 114-122.

[71]. Makarla, P. B., Saboorian, M. H., Ashfaq, R., Toyooka, K. O., Toyooka, S., Minna, J. D., Gazdar, A. F., Schorge, J. O., 2005, Promoter hypermethylation profile of ovarian epithelial neoplasms, *Clinical cancer research*, 11(15), 5365-5369.

[72]. Akers, S. N., Moysich, K., Zhang, W., Lai, G. C., Miller, A., Lele, S., Odunsi, K., Karpf, A. R., 2014, LINE1 and Alu repetitive element DNA methylation in tumors and white blood cells from epithelial ovarian cancer patients, *Gynecologic oncology*, 132(2), 462-467.

[73]. Woloszynska-Read, A., Zhang, W., Yu, J., Link, P. A., Mhawech-Fauceglia, P., Collamat, G., Akers, S. N., Ostler, K. R., Godley, L. A., Odunsi, K., 2011, Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage, *Clinical cancer research*, 17(8), 2170-2180.

[74]. Widschwendter, M., Jiang, G., Woods, C., Müller, H. M., Fiegl, H., Goebel, G., Marth, C., Müller-Holzner, E., Zeimet, A. G., Laird, P. W., 2004, DNA hypomethylation and ovarian cancer biology, *Cancer research*, 64(13), 4472-4480.

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

[76]. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., Bartel, D. P., 2001, An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans, *Science*, 294(5543), 858-862.

[77]. Macfarlane, L. A., Murphy, P. R., 2010, MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer, *Current Genomics*, 11(7), 537-61.

[78]. Di Leva, G., Croce, C. M., 2010, Roles of small RNAs in tumor formation, *Trends in molecular medicine*, 16(6), 257-267.

[79]. Pan, C., Stevic, I., Müller, V., Ni, Q., Oliveira-Ferrer, L., Pantel, K., Schwarzenbach, H., 2018, Exosomal micro RNA s as tumor markers in epithelial ovarian cancer, *Molecular oncology*, 12(11), 1935-1948.

[80]. Dahiya, N., Morin, P. J., 2010, MicroRNAs in ovarian carcinomas, *Endocrine-related cancer*, 17(1), F77-F89.

[81]. Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.-G., Alder, H., 2007, MicroRNA signatures in human ovarian cancer, *Cancer research*, 67(18), 8699-8707.

[82]. Chung, Y.W., Bae, H.-S., Song, J.Y., Lee, J. K., Lee, N. W., Kim, T., Lee, K.W., 2013, Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patient, *International journal of gynecologic cancer*, 23(4).

[83]. Siomi, H., Siomi, M. C., 2010, Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals, *Molecular cell*, 38(3), 323-32.

[84]. Finnegan, E. F., Pasquinelli, A. E., 2013, MicroRNA biogenesis: regulating the regulators, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(1), 51-68.

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

[86]. Gregory, R. I., Shiekhattar, R., 2005, MicroRNA Biogenesis and Cancer, *Cancer research*, 65(9), 3509-3512.

[87]. Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., Kim, V. N., 2003, The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing, *Nature*, 425(6956), 415-9.

[88]. Yeom, K. H., Lee, Y., Han, J., Suh, M. R., Kim, V. N., 2006, Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing, *Nucleic acids research*, 34(16), 4622-9.

[89]. Han, J., Pedersen, J. S., Kwon, S. C., Belair, C. D., Kim, Y. K., Yeom, K. H., Yang, W. Y., Haussler, D., Blelloch, R., Kim, V. N., 2009, Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8, *Cell*, 136(1), 75-84.

[90]. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., Gorlich, D., 2004, Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs, *Rna*, 10(2), 185-91.

[91]. Lei, E. P., Silver, P. A., 2002, Protein and RNA export from the nucleus, *Developmental cell*, 2(3), 261-72.

[92]. Zeng, Y., Cullen, B. R., 2004, Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5, *Nucleic acids research*, 32(16), 4776-85.

[93]. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., Mello, C. C., 2001, Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing, *Cell*, 106(1), 23-34.

[94]. Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., Dreyfuss, G., 2002, miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs, *Genes & development*, 16(6), 720-728.

[95]. Maniataki, E., Mourelatos, Z., 2005, A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA, *Genes Development*, 19(24), 2979-90.

[96]. Kozomara, A., Birgaoanu, M., Griffiths-Jones, S., 2018, miRBase: from microRNA sequences to function, *Nucleic acids research*, 47(D1), D155-D162.

[97]. Brabletz, S., Brabletz, T., 2010, The ZEB/miR-200 feedback loop a motor of cellular plasticity in development and cancer?, *EMBO reports*, 11(9), 670-677.

[98]. Junqueira, L. C. O., Carneiro, J., 1980, Basic histology, ISBN: 0870412027.

[99]. Kalluri, R., Neilson, E. G., 2003, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis, *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1776-1784.

[100]. Kalluri, R., Weinberg, R. A., 2009, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428.

[101]. Leung, P. C., Adashi, E. Y., 2018, The ovary, Academic Press, ISBN: 0128132108.

[102]. Zeisberg, M., Neilson, E. G., 2009, Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1429-1437.

[103]. Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., Bradley, A., 1999, Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation, *Nature genetics*, 22(4), 361-365.

[104]. Sauka-Spengler, T., Bronner-Fraser, M., 2008, A gene regulatory network orchestrates neural crest formation, *Nature reviews molecular cell biology*, 9(7), 557-568.

[105]. Neilson, E. G., 2005, Setting a trap for tissue fibrosis, *Nature medicine*, 11(4), 373-4.

[106]. Kalluri, R., 2009, EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells, *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1417-1419.

[107]. Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., Thompson, E. W., 2006, The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease, *Journal of cell biology*, 172(7), 973-981.

[108]. Inoue, T., Umezawa, A., Takenaka, T., Suzuki, H., Okada, H., 2015, The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models, *Kidney international*, 87(1), 233-238.

[109]. Jayachandran, A., Königshoff, M., Yu, H., Rupniewska, E., Hecker, M., Klepetko, W., Seeger, W., Eickelberg, O., 2009, SNAI transcription factors mediate epithelial–mesenchymal transition in lung fibrosis, *Thorax*, 64(12), 1053-1061.

[110]. Xue, C., Plieth, D., Venkov, C., Xu, C., Neilson, E. G., 2003, The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis, *Cancer research*, 63(12), 3386-3394.

[111]. Fan, F., Samuel, S., Evans, K. W., Lu, J., Xia, L., Zhou, Y., Sceusi, E., Tozzi, F., Ye, X. C., Mani, S. A., 2012, Overexpression of Snail induces epithelial–mesenchymal transition and a cancer stem cell–like phenotype in human colorectal cancer cells, *Cancer medicine*, 1(1), 5-16.

[112]. Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. A., Knuechel, R., Kirchner, T., 2001, Variable β-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment, *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(18), 10356-10361.

[113]. Pachmayr, E., Treese, C., Stein, U., 2017, Underlying mechanisms for distant metastasis-molecular biology, *Visceral medicine*, 33(1), 11-20.

[114]. Gheldof, A., Berx, G., 2013, in Progress in molecular biology and translational science, Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition, Elsevier, ISBN: 1877-1173, 317-336.

[115]. Denardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., Coussens, L. M., 2009, CD4+ T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages, *Cancer cell*, 16(2), 91-102.

[116]. Valastyan, S., Weinberg, R. A., 2011, Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, *Cell*, 147(2), 275-292.

[117]. Huang, R. Y.J., Guilford, P., Thiery, J. P., Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. 2012, The Company of Biologists Ltd.

[118]. Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J.P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., 2005, Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement, *Oncogene*, 24(27), 4330-4339.

[119]. Song, J., 2007, EMT or apoptosis: a decision for TGF-β, *Cell research*, 17(4), 289-290.

[120]. Gonzalez, D. M., Medici, D., 2014, Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition, *Science signaling*, 7(344), re8-re8.

[121]. Tse, J. C., Kalluri, R., 2007, Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment, *Journal of cellular biochemistry*, 101(4), 816-829.

[122]. Yang, J., Mani, S. A., Weinberg, R. A., 2006, Exploring a new twist on tumor metastasis, *Cancer research*, 66(9), 4549-4552.

[123]. Oft, M., Heider, K.H., Beug, H., 1998, TGFβ signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis, *Current Biology*, 8(23), 1243-1252.

[124]. Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H., Dijke, P. T., 1999, TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells, *Journal of cell science*, 112(24), 4557-4568.

[125]. Wrana, J. L., 2000, Regulation of Smad activity, *Cell*, 100(2), 189-192.

[126]. Lustig, B., Behrens, J., 2003, The Wnt signaling pathway and its role in tumor development, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129(4), 199-221.

[127]. Nusse, R., 2005, Wnt signaling in disease and in development, *Cell research*, 15(1), 28-32.

[128]. Duchartre, Y., Kim, Y.M., Kahn, M., 2016, The Wnt signaling pathway in cancer, *Critical reviews in oncology/hematology*, 99, 141-149.

[129]. Cadigan, K. M., Liu, Y. I., 2006, Wnt signaling: complexity at the surface, *Journal of cell science*, 119(3), 395-402.

[130]. Chen, X., Yang, J., Evans, P. M., Liu, C., 2008, Wnt signaling: the good and the bad, *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(7), 577-594.

[131]. Teo, J.L., Kahn, M., 2010, The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: a tale of two coactivators, *Advanced drug delivery reviews*, 62(12), 1149-1155.

[132]. Veeman, M. T., Axelrod, J. D., Moon, R. T., 2003, A second canon: functions and mechanisms of β-catenin-independent Wnt signaling, *Developmental cell*, 5(3), 367-377.

[133]. Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., Tarui, H., Sasaki, H., 2008, Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex, *Developmental cell*, 15(1), 23-36.

[134]. Huelsken, J., Behrens, J., 2002, The Wnt signalling pathway, *Journal of cell science*, 115(21), 3977-3978.

[135]. Penton, A. L., Leonard, L. D., Spinner, N. B., 2012, Notch signaling in human development and disease, *Seminars in cell and developmental biology*, 23(4), 450-7.

[136]. Dexter, J. S., 1914, The analysis of a case of continuous variation in Drosophila by a study of its linkage relations, *The American naturalist*, 48(576), 712-758.

[137]. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., Lake, R. J., 1999, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science*, 284(5415), 770-776.

[138]. Yamamoto, S., Schulze, K. L., Bellen, H. J., 2014, in Notch Signaling, Introduction to Notch signaling, Springer, 1-14.

[139]. Vorontchikhina, M. A., Zimmermann, R. C., Shawber, C. J., Tang, H., Kitajewski, J., 2005, Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation, *Gene expression patterns*, 5(5), 701-709.

[140]. Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A., 2007, Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?, *Nature reviews cancer*, 7(6), 415-428.

[141]. Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., De Herreros, A. G., 2000, The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells, *Nature cell biology*, 2(2), 84-89.

[142]. Hartwell, K. A., Muir, B., Reinhardt, F., Carpenter, A. E., Sgroi, D. C., Weinberg, R. A., 2006, The Spemann organizer gene, Goosecoid, promotes tumor metastasis, *Proceedings of the national academy of sciences*, 103(50), 18969-18974.

[143]. Mani, S. A., Yang, J., Brooks, M., Schwaninger, G., Zhou, A., Miura, N., Kutok, J. L., Hartwell, K., Richardson, A. L., Weinberg, R. A., 2007, Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers, *Proceedings of the national academy of sciences*, 104(24), 10069-10074.

[144]. Zhang, H., Meng, F., Liu, G., Zhang, B., Zhu, J., Wu, F., Ethier, S. P., Miller, F., Wu, G., 2011, Forkhead transcription factor foxq1 promotes epithelial–mesenchymal transition and breast cancer metastasis, *Cancer research*, 71(4), 1292-1301.

[145]. Wang, X., Zheng, M., Liu, G., Xia, W., Mckeown-Longo, P. J., Hung, M.C., Zhao, J., 2007, Krüppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion, *Cancer research*, 67(15), 7184-7193.

[146]. Grau, Y., Carteret, C., Simpson, P., 1984, Mutations and chromosomal rearrangements affecting the expression of snail, a gene involved in embryonic patterning in Drosophila melanogaster, *Genetics*, 108(2), 347-360.

[147]. Nieto, M. A., 2002, The snail superfamily of zinc-finger transcription factors, *Nature reviews molecular cell biology*, 3(3), 155-166.

[148]. Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S.-I., Kita, T., 2000, A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix–loop–helix transcription factor activities via specific E-box motifs, *Nucleic acids research*, 28(2), 626-633.

[149]. Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., Del Barrio, M. G., Portillo, F., Nieto, M. A., 2000, The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression, *Nature cell biology*, 2(2), 76-83.

[150]. Smith, B. N., Odero-Marah, V. A., 2012, The role of Snail in prostate cancer, *Cell adhesion & migration*, 6(5), 433-441.

[151]. Lee, Y. M., Park, T., Schulz, R. A., Kim, Y., 1997, Twist-mediated activation of the NK-4 homeobox gene in the visceral mesoderm of Drosophila requires two distinct clusters of E-box regulatory elements, *Journal of biological chemistry*, 272(28), 17531-17541.

[152]. Lee, M. S., Lowe, G. N., Strong, D. D., Wergedal, J. E., Glackin, C. A., 1999, TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, can regulate the human osteogenic lineage, *Journal of cellular biochemistry*, 75(4), 566-577.

[153]. Onder, T. T., Gupta, P. B., Mani, S. A., Yang, J., Lander, E. S., Weinberg, R. A., 2008, Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways, *Cancer research*, 68(10), 3645-3654.

[154]. Xue, G., Restuccia, D. F., Lan, Q., Hynx, D., Dirnhofer, S., Hess, D., Rüegg, C., Hemmings, B. A., 2012, Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF-β signaling axes, *Cancer discovery*, 2(3), 248-259.

[155]. Gheldof, A., Hulpiau, P., Van Roy, F., De Craene, B., Berx, G., 2012, Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors, *Cellular and molecular life sciences*, 69(15), 2527-2541.

[156]. Vandewalle, C., Van Roy, F., Berx, G., 2009, The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease, *Cellular and molecular life sciences*, 66(5), 773-787.

[157]. Williams, T., Moolten, D., Burlein, J., Romano, J., Bhaerman, R., Godillot, A., Mellon, M., Rauscher, F. D., Kant, J., 1991, Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression, *Science*, 254(5039), 1791-1794.

[158]. Aigner, K., Dampier, B., Descovich, L., Mikula, M., Sultan, A., Schreiber, M., Mikulits, W., Brabletz, T., Strand, D., Obrist, P., 2007, The transcription factor ZEB1 (δ EF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity, *Oncogene*, 26(49), 6979-6988.

[159]. Graham, T. R., Zhau, H. E., Odero-Marah, V. A., Osunkoya, A. O., Kimbro, K. S., Tighiouart, M., Liu, T., Simons, J. W., O'regan, R. M., 2008, Insulin-like growth factor-I–dependent up-regulation of ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells, *Cancer research*, 68(7), 2479-2488.

[160]. Spaderna, S., Schmalhofer, O., Hlubek, F., Berx, G., Eger, A., Merkel, S., Jung, A., Kirchner, T., Brabletz, T., 2006, A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer, *Gastroenterology*, 131(3), 830-840.

[161]. Verschueren, K., Remacle, J. E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B. S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M.-T., Bodmer, R., 1999, SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5′-CACCT sequences in candidate target genes, *Journal of biological chemistry*, 274(29), 20489-20498.

[162]. Larsen, J. E., Nathan, V., Osborne, J. K., Farrow, R. K., Deb, D., Sullivan, J. P., Dospoy, P. D., Augustyn, A., Hight, S. K., Sato, M., 2016, ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer, *The Journal of clinical investigation*, 126(9), 3219-3235.

[163]. Sahay, D., Leblanc, R., Grunewald, T. G., Ambatipudi, S., Ribeiro, J., Clézardin, P., Peyruchaud, O., 2015, The LPA1/ZEB1/miR-21-activation pathway regulates metastasis in basal breast cancer, *Oncotarget*, 6(24), 20604.

[164]. Suzuki, K., Kawataki, T., Endo, K., Miyazawa, K., Kinouchi, H., Saitoh, M., 2018, Expression of ZEBs in gliomas is associated with invasive properties and histopathological grade, *Oncology letters*, 16(2), 1758-1764.

[165]. Zhang, P., Sun, Y., Ma, L., 2015, ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance, *Cell cycle*, 14(4), 481-487.

[166]. Harb, O. A., Elfeky, M. A., El Shafaay, B. S., Taha, H. F., Osman, G., Harera, I. S., Gertallah, L. M., Abdelmonem, D. M., Embaby, A., 2018, SPOP, ZEB-1 and E-cadherin

expression in clear cell renal cell carcinoma (cc-RCC): Clinicopathological and prognostic significance, *Pathophysiology*, 25(4), 335-345.

[167]. Bendoraite, A., Knouf, E. C., Garg, K. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., O'briant, K. C., Ventura, A. P., Godwin, A. K., Karlan, B. Y., Drescher, C. W., Urban, N., Knudsen, B. S., Tewari, M., 2010, Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: Evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition, *Gynecologic oncology*, 116(1), 117-125.

[168]. Zhang, Y., Xu, L., Li, A., Han, X., 2019, The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 400-408.

[169]. Ding, X.-M., 2014, MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT), *Chinese journal of cancer*, 33(3), 140-147.

[170]. Paterson, E. L., Kazenwadel, J., Bert, A. G., Khew-Goodall, Y., Ruszkiewicz, A., Goodall, G. J., 2013, Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression, *Neoplasia*, 15(2), 180-IN22.

[171]. Moes, M., Le Béchec, A., Crespo, I., Laurini, C., Halavatyi, A., Vetter, G., Del Sol, A., Friederich, E., 2012, A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition, *PloS one*, 7(4), e35440.

[172]. Esquela-Kerscher, A., Slack, F. J., 2006, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer, *Nature reviews cancer*, 6(4), 259-69.

[173]. Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M. J., Tuschl, T., Margalit, H., 2005, Clustering and conservation patterns of human microRNAs, *Nucleic acids research*, 33(8), 2697-706.

[174]. Humphries, B., Yang, C., 2015, The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy, *Oncotarget*, 6(9), 6472-98.

[175]. Bracken, C. P., Gregory, P. A., Kolesnikoff, N., Bert, A. G., Wang, J., Shannon, M. F., Goodall, G. J., 2008, A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition, *Cancer research*, 68(19), 7846-54.

[176]. Siemens, H., Jackstadt, R., Hünten, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U., Hermeking, H., 2011, miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions, *Cell cycle*, 10(24), 4256-71.

[177]. Tao, Z. H., Wan, J. L., Zeng, L. Y., Xie, L., Sun, H. C., Qin, L. X., Wang, L., Zhou, J., Ren, Z. G., Li, Y. X., Fan, J., Wu, W. Z., 2013, miR-612 suppresses the invasive-metastatic cascade in hepatocellular carcinoma, *Journal of experimental medicine*, 210(4), 789-803.

[178]. Paul, A., Paul, S., 2014, The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers, *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 19, 605.

[179]. Pal, M. K., Jaiswar, S. P., Dwivedi, V. N., Tripathi, A. K., Dwivedi, A., Sankhwar, P., 2015, MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer, *Cancer biology & medicine*, 12(4), 328.

[180]. Gümüşoğlu, E., 2016, *Over kanserinde miRNA analizi ile moleküler tanı ve izleme*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[181]. Tekarslan, E. E., 2018, *Over kanseri tümörlerinde farklılaşmış miRNA'ların validasyonu*, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[182]. Katz, B., Reis, S. T., Viana, N. I., Morais, D. R., Moura, C. M., Dip, N., Silva, I. A., Iscaife, A., Srougi, M., Leite, K. R., 2014, Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer, *PloS one*, 9(11), e113700.

[183]. Lewis, B. P., Burge, C. B., Bartel, D. P., 2005, Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell*, 120(1), 15-20.

[184]. Zuberi, M., Mir, R., Das, J., Ahmad, I., Javid, J., Yadav, P., Masroor, M., Ahmad, S., Ray, P., Saxena, A., 2015, Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features, *Clinical and translational oncology*, 17(10), 779-787.

[185]. Wang, W., Wu, L.R., Li, C., Zhou, X., Liu, P., Jia, X., Chen, Y., Zhu, W., 2019, Five serum microRNAs for detection and predicting of ovarian cancer, *European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology: X*, 3, 100017.

[186]. Meng, X., Müller, V., Milde-Langosch, K., Trillsch, F., Pantel, K., Schwarzenbach, H., 2016, Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer, *Oncotarget*, 7(13), 16923.

[187]. Panda, H., Pelakh, L., Chuang, T.D., Luo, X., Bukulmez, O., Chegini, N., 2012, Endometrial miR-200c is altered during transformation into cancerous states and targets the expression of ZEBs, VEGFA, FLT1, IKKβ, KLF9, and FBLN5, *Reproductive sciences*, 19(8), 786-796.

[188]. Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., Goodall, G. J., 2008, The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1, *Nature cell biology*, 10(5), 593-601.

[189]. Korpal, M., Lee, E. S., Hu, G., Kang, Y., 2008, The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin

transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2, *Journal of biological chemistry*, 283(22), 14910-14914.

[190]. Baldi, P., Long, A. D., 2001, A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes, *Bioinformatics*, 17(6), 509-519.

[191]. Van Jaarsveld, M. T. M., Helleman, J., Berns, E. M. J. J., Wiemer, E. a. C., 2010, MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(8), 1282-1290.

[192]. Christiansen, J. J., Rajasekaran, A. K., 2006, Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis, *Cancer research*, 66(17), 8319-8326.

[193]. Savagner, P., 2001, Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition, *Bioessays*, 23(10), 912-923.

[194]. Faleiro-Rodrigues, C., Macedo-Pinto, I., Pereira, D., Lopes, C., 2004, Prognostic value of E-cadherin immunoexpression in patients with primary ovarian carcinomas, *Annals of oncology*, 15(10), 1535-1542.

[195]. Sivertsen, S., Berner, A., Michael, C. W., Bedrossian, C., Davidson, B., 2006, Cadherin expression in ovarian carcinoma and malignant mesothelioma cell effusions, *Acta cytologica*, 50(6), 603-607.

[196]. Yoshida, J., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Hayashi, A., Osada, R., Ohira, S., Shiozawa, T., Konishi, I., 2009, Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression, *Medical molecular morphology*, 42(2), 82-91.

[197]. Wu, Y., Zhou, B. P., 2010, Snail: more than EMT, *Cell adhesion & migration*, 4(2), 199-203.

[198]. Steinert, P. M., Roop, D. R., 1988, Molecular and cellular biology of intermediate filaments, *Annual review of biochemistry*, 57(1), 593-625.

[199]. Huo, Y., Zheng, Z., Chen, Y., Wang, Q., Zhang, Z., Deng, H., 2016, Downregulation of vimentin expression increased drug resistance in ovarian cancer cells, *Oncotarget*, 7(29), 45876.

[200]. Sun, Y., Hu, L., Zheng, H., Bagnoli, M., Guo, Y., Rupaimoole, R., Rodriguez-Aguayo, C., Lopez-Berestein, G., Ji, P., Chen, K., 2015, MiR-506 inhibits multiple targets in the epithelial-to-mesenchymal transition network and is associated with good prognosis in epithelial ovarian cancer, *The Journal of pathology*, 235(1), 25-36.

[201]. Yao, D., Dai, C., Peng, S., 2011, Mechanism of the mesenchymal–epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation, *Molecular cancer research*, 9(12), 1608-1620.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Karar Formu.

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

Sayı : 1296 **Tarih : 12.11.2019**
Konu: Prof. Dr. Tuba GÜNEL hk.

Sayın Prof. Dr. Tuba GÜNEL
Fen Fakültesi

İlgi : Fen Fakültesi Dekanlığının 19/09/2019 gün ve 188009 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Merve ŞENTÜRK' ün yürüteceği 2019/1206 dosya numaralı "Over Kanserinde miR-200 Ailesinin Epitelyal-Mezenkimal Geçişteki Rolü" başlıklı çalışma, kurulumuzun 08/11/2019 tarih ve 18 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yagız URESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

EK 1. Etik Kurul Karar Formu (devam).

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ FİZİK TEDAVİ BİNASI KAT:2 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Over Kanserinde miR-200 Ailesinin Epitelyal-Mezenkimal Geçişteki Rolü"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Prof. Dr. Tuba GÜNEL**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**İnsan Genetiği**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü**			
	DESTEKLEYİCİ	**İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi**			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Over Kanserinde miR-200 Ailesinin Epitelyal-Mezenkimal Geçişteki Rolü"**

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	24.09.2019		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ		
	Karar No: 18	**Tarih: 08/11/2019**
	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde görevli **Prof. Dr. Tuba GÜNEL' in** sorumluluğunda ve **Merve ŞENTÜRK' ün** yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	**19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik**
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ☐	H ■	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve ŞENTÜRK
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.
Uyruğu	☑ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik (Çift Anadal)
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokunun.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı