



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**PROSTAT KANSERLİ OLGULARDA miRNA İFADELENME
DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

VENHAR GÜRBÜZ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

EYLÜL 2021



**PROSTAT KANSERLİ OLGULARDA miRNA İFADELENME
DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

Venhar GÜRBÜZ

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

02/09/2021

Venhar GÜRBÜZ

**PROSTAT KANSERLİ OLGULARDA miRNA İFADELENME DÜZEYLERİNİN
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**
(Doktora Tezi)

Venhar GÜRBÜZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2021

ÖZET

Epigenomun önemli bir bileşeni olan mikroRNA'lar (miR'ler), sinyal yolağındaki hedef genlerin transkriptom düzeyinde ifadenmesini modüle ederek kanser gelişiminde etkin rol oynarlar. Bu tez çalışmasında ilk olarak prostat kanserinde (PCa) yeni miRNA sınıfı olan epi-miRNA'ların ekspresyon seviyesi klinikopatolojik (Gleason Skoru, PSA seviyeleri, TNM Evreleme) evrelere göre kantitatif real time PCR metodu ile araştırılmıştır. Daha sonra ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunan 11 epi-miRNA'nın promoter metilasyon seviyeleri metilasyon spesifik kantitatif real time PCR metodu ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, miRNA'ların promoter bölgelerinde, PSA seviyeleri (miR-34b / c, miR-148a, miR-152), GS'ler (miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-148a, miR-152, miR-185-5p) ve T evreleme (miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-140, miR-148a, miR-152, miR-185-5p) ile doğru orantılı artış gösteren hipometilasyon bulunmuştur. miR-200a/b klinikopatolojik parametrelere göre değerlendirildiğinde, lokal/lokal ileri PCa'da onko-miR, metastatik aşamada tümör baskılayıcı miR olarak görev yapmaktadır. Bir sonraki aşamada PCa'da up-regüle olduğunu bulduğumuz miR-34b, miR-34c, miR-148a, miR-152, miR-200a, miR-200b epi-miRNA'lar (miR-200a ve b metastatik evrede down-regüle olarak tanımlanmıştır) ile onların hedef genleri olan DNA Metiltransferaz (DNMT1, 3a, 3b), PTEN ve NKX3.1'in "epi-miRNA-mRNA" düzenleyici ağı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda miR-148a, miR-152 ve miR-200b'nin DNMT1'in ifadenmesini arttırıp, PTEN genini baskıladığı gösterilmiştir. PCa'nın metastatik yönetiminde epi-miRNA-mRNA çift yönlü geri beslenme döngüsüne ve anti-kanser terapötiklerinde metilasyon örüntüsüne dikkat çeken bu tez çalışması, PCa'da tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak miRNA'ların ve metilasyon sürecinin ve bu süreçte yer alan genlerin mRNA ve miRNA ifade profillerinin bütünleştirici analizine de dikkat çekmesi açısından yeni, öncü ve önemli bir tez çalışmasıdır.

Bilim Kodu : 1055.1

Anahtar Kelimeler : Prostat Kanseri, Epigenetik, DNMT, PTEN, Epi-miRNA, DNA Metilasyonu

Sayfa Adedi : 88

Danışman : Prof. Dr. Ece KONAÇ

COMPARATIVE ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION LEVELS IN
PROSTATE CANCER PATIENTS
(Ph. D. Thesis)

Venhar GÜRBÜZ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

September 2021

ABSTRACT

MicroRNAs (miRs) take part in modulating the expression of target genes in the signal pathway on transcriptome level in carcinogenesis. In this thesis firstly, the expression level of epi-miRNAs, which be a new miRNA class and evaluating as clinicopathologically in prostate cancer (PCa) were investigated by quantitative real-time PCR method. Then, promoter methylation levels of 11 epi-miRNAs, whose expression levels were found to be significantly higher, were examined by methylation-specific quantitative real-time PCR method. According to the results, hypomethylation was found in the promoter regions of miRNAs that showed a direct proportional increase with PSA levels (miR-34b/c, miR-148a, miR-152), GS's (miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-148a, miR-152, miR-185-5p) and T staging (miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-140, miR-148a, miR-152, miR-185-5p). When miR-200a/b was evaluated according to clinicopathological parameters, it acted as an onco-miR in local/local advanced PCa and as a tumor-suppressor-miR in the metastatic stage. In the next stage, the "epi-miRNA-mRNA" regulatory network was investigated between miR-34b, miR-34c, miR-148a, miR-152, miR200a, miR-200b epi-miRNAs that was found up-regulated (miR-200a and b were identified as down-regulated at the metastatic stage) and their target genes (DNMT1, 3a, 3b, PTEN and NKX3.1) in PCa. it has been shown that miR-148a, miR-152 and miR-200b increase the expression of DNMT1 and suppress the PTEN gene. it has been emphasized the "epi-miRNA-mRNA" bidirectional feedback loop and highlighted the methylation pattern in PCa anti-cancer therapeutics. It is a new, pioneer and crucial thesis in that it draws attention to the integrative analysis of the mRNA-miRNA expression profiles of miRNAs, methylation process and genes involved in this process as diagnostic and prognostic biomarkers in PCa.

Science Code : 1055.1

Key Words : Prostate Cancer, Epigenetics, DNMTs, PTEN, Epi-miRNA, DNA Methylation

Page Number : 88

Supervisor : Prof. Dr. Ece KONAÇ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora eğitimim dahil lisansüstü eğitim hayatım boyunca sonsuz bir anlayış ve sabırla, tüm bilgi birikimini, tecrübelerini, sakınmadan benimle paylaşarak yolumu aydınlatan, bana ışık olan, bir hoca olmaktan çok öte bir özveriyle, sadece eğitim hayatıma değil bütün hayatıma dokunan, kimsenin yerini asla dolduramayacağı canım Hocam, sevgili danışmanım Prof. Dr. Ece KONAÇ 'a en içten, en büyük ve en sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın en büyük iyikilerindensiniz hocam..

Doktora tez izleme komitemde yer alan ve desteklerini benden hiç esirgemeyen Hacettepe Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Cenk Yücel BİLEN hocama ve bölümümüz Öğretim Üyesi Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM hocama desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hasta kanlarının teminini ve klinik bilgilerini koordine ederek tez çalışmama destek veren Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sinan SÖZEN hocama, deneyler sonrası istatistiksel çalışmalara destek veren Halk Sağlığı Anabilim Dalından Doç. Dr. Asiye UĞRAŞ DİKMEN hocama, bölümümüz Öğretim Üyesi Doç. Dr. H. İlke ÖNEN hocama bilgi ve birikimlerini benimle paylaştıkları için teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamı 01/2019-11 ve 01/2020-19 kodlu projeler ile desteklediği için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri birimine teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitim hayatım süresince desteğini sürekli hissettiğim, akademik hayata adım atmamı ve bu yolda devam etmemi sağlayan çok değerli Hocam Prof. Dr. Mehmet CEYHAN 'a bana bu şansı verdiği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, benim değerli ailem, her zaman desteklerini hissettiğim ellerini üzerimden hiç çekmeden, bıkmadan, usanmadan yanımda olan sevgili annem ve babama tüm zorlukları benimle birlikte üstlenip hep yanımda olduğunuz için minnettarım. O kadar kıymetlisiniz ki hep var olun..

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Prostat Anatomisi	6
2.3. Prostat Kanseri	7
2.4. Prostat Kanser Epidemiyolojisi	8
2.5. Prostat Kanser Biyoloji ve Genetiği	8
2.6. Epigenetik	9
2.6.1. Histon modifikasyonları	11
2.6.2. DNA metilasyonu	12
2.6.3. miRNA'lar ve epi-miRNA keşfi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereçler	17
3.1.1. Kullanılan cihazlar	17
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler	17
3.1.3. Kullanılan kitler	18
3.2. Yöntemler	18
3.2.1. Periferik kan örneklerinin toplanması	18

3.2.2.	Kandan serum/plazma elde edilmesi.....	19
3.2.3.	miRNA izolasyonu	20
3.2.4.	Primerlerin tasarımı	21
3.2.5.	cDNA eldesi ve fluorimetrik ölçüm.....	21
3.2.5.	miRNA kantitatif real time PCR yöntemi (RT-qPCR).....	22
3.2.6.	Metilasyon PCR primer dizaynı	22
3.2.7.	DNA izolasyonu	23
3.2.8.	Bisülfid modifikasyon yöntemi	24
3.2.9.	Kantitatif metilasyon real time PCR yöntemi (MS-qPCR).....	25
3.2.10.	RNA izolasyonu	25
3.2.11.	cDNA eldesi ve fluorimetrik ölçüm.....	26
3.2.12.	mRNA kantitatif real time PCR yöntemi.....	26
3.2.13.	İstatistiksel analiz.....	27
4.	BULGULAR.....	29
5.	TARTIŞMA.....	49
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	63
	KAYNAKLAR.....	65
	EKLER.....	81
	EK-1. Etik Kurul	82
	ÖZGEÇMİŞ	83

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Hastaların klinikopatolojik özellikleri	19
Çizelge 3.2. Çalışılan epi-miRNA'ların listesi	21
Çizelge 3.3. Kantitatif metilasyon spesifik PCR primerleri.....	23
Çizelge 3.4. Kantitatif mRNA PCR Primerleri	27
Çizelge 3.5. miRNA ifadenme ve metilasyon seviyeleri ile PSA düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri.	34
Çizelge 3.6. miRNA ifadenme ve metilasyon seviyeleri ile gleason skora düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. ...	38
Çizelge 3.7. miRNA ifadenme ve metilasyon seviyeleri ile T evreleme düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. ...	41
Çizelge 3.8. DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN, NKX3.1 gen ifadenme düzeylerinin kontrol, PCa ve Met-PCa grupları arasındaki üçlü karşılaştırılması (Kruskal-Wallis-H testi sonuçları).....	44
Çizelge 3.9. Kruskal-Wallis-H testi ile anlamlı bulunan DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN genlerinin ifadenme seviyelerinin gruplar arası farklılığını gösteren Post Hoc Test sonuçları	45
Çizelge 3.10. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarındaki DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ekspresyon düzeylerinin PSA seviyelerine göre karşılaştırmalı analizi.	46
Çizelge 3.11. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarındaki DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ekspresyon düzeylerinin Gleason Skoruna göre karşılaştırmalı analizi.	46
Çizelge 3.12. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarındaki DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ekspresyon düzeylerinin TNM evreleme sistemine göre karşılaştırmalı analizi	47
Çizelge 3.13. Epi-miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki lineer regresyon analiz sonuçları	47

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2. 1. Kanser hücrelerinin on temel özelliği	6
Şekil 2. 2. Prostat kanseri risk faktörleri	9
Şekil 2. 3. Tümörögenizde genetik ve epigenetik	10
Şekil 2. 4. Epigenetik mekanizmalar	11
Şekil 2. 5. Nükleozomun şematik gösterimi.....	12
Şekil 2. 6. Kanser oluşumuna katkı sağlayan anormal DNA metilasyonu	13
Şekil 2. 7. miRNA biyogenezi	14
Şekil 2. 8. miRNA ve DNA Metilasyonu arasındaki epigenetik etkileşimler.....	15
Şekil 2. 9. Epigenetik değıştiriciler ve farklı miRNA türleri arasındaki düzenleyici yörünge.....	16
Şekil 3.1. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarının DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN, NKX3.1 gen ifadelenme düzeyleri gözönüne alınarak karşılaştırılması sonucunda elde edilen kutu grafiğı (box-plot).....	44
Şekil 5. 1. Promoter metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik veriler arasında korelasyon gösteren miRNA'lar	53
Şekil 5. 2. Grafik özeti	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
pM	Pikomol
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat
U	Unite
%	Yüzde
ng	Nanogram
dk	Dakika
sn	Saniye
$\geq$	Büyük eşit
$<$	Küçük
$>$	Büyük
$\leq$	Küçük eşit

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ADP	Adenozin di fosfat
BPH	Benign prostat hiperplazisi
cDNA	Komplementer DNA
DGCR8	DiGeorge sendrom kritik bölge 8
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DNMT	DNA metiltransferaz
dNTP	Deoksi nükleotit trifosfat
FC	Katsayı değişimi
G-C	Guanin-Sitozin
GS	Gleason skor
H	Histon
Met-PCa	Metastatik prostat kanseri
miRNA	mikroRNA
MSP	Metilasyon spesifik PCR
ncRNA	Kodlanmayan RNA
NKX3.1	NK3 homeobox 1
PCa	Prostat kanseri
PI3K	Fosfoinozitol-3 kinaz
PIN	Prostatik intraepitelyal neoplazi
PSA	Prostat spesifik antijen
PTEN	Fosfat ve tensin homolog
RNA	Ribonükleik asit
RT	Reverse transkriptaz
RT-PCR	Real time polimeraz zincir reaksiyonu
TNM	Tümör, lenf nodu, metastaz

1. GİRİŞ

Prostat kanseri (PCa) erkeklerde en sık görülen kanserler arasındadır ve genetik ve epigenetik faktörleri de içeren multifaktoriyel bir hastalık olarak tanımlanır. Prostat spesifik antijen (PSA) değerinin ölçümü ve rektal muayene, PCa'nın belirlenmesinin temel aşamasıdır. PSA prostata özgüdür, ancak PCa'ya özgü değildir ve prostat ile ilgili diğer hastalıklarda da artış gösterebilir.

Epigenetik, nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın gen ifadesindeki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Kanser ile ilişkili genlerin aktivasyonu ya da inaktivasyonu, epigenetik mekanizmalar tarafından düzenlenebilir. DNA metilasyonu, kovalent histon modifikasyonu, histon varyantları gibi kovalent olmayan mekanizmalar ile nükleozom yeniden modelleme ve küçük kodlamayan RNA'ları (miRNA) içeren epigenetik mekanizmalar, gen ifadesinin düzenlenmesi ve diğer hücresel faaliyetler için önemli rol üstlenmektedir. Kanserın tespiti, tedavinin takibi ve yüksek risk taramasında yer alan epigenetik belirleyiciler tanımlanmış ve epigenetik tedavi, kanser önleme için umut veren bir strateji oluşturmuştur.

miRNA'lar gen ifadesinin düzenleyicileri olarak post-transkripsiyonel aşamada işlev gören, 21-24 nükleotid uzunluğunda, kodlayıcı olmayan (ncRNA) RNA'lardır. Hedef mRNA ile komplementerlik sonucuna göre, mRNA parçalanmakta ya da translasyon durdurulmaktadır. miRNA ifadelenmesindeki bozulma pek çok kanserde tanımlanmıştır.

miRNA'lar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi diğer epigenetik mekanizmaları da post-transkripsiyonel seviyede düzenleyebilmektedir. miRNA ve metilasyon mekanizmaları arasındaki epigenetik etkileşimlerin aydınlatılması, yeni prognostik belirteçlerin ve biyolojik verilerin bulunabilmesine yardımcı olabilecektir. Bu epigenetik etkileşimler, tek başına miRNA veya metilasyon ile değil hem metilasyon hem de miRNA verileri entegre edilerek tespit edilebilen yeni prognostik belirteçler olabilir. Epi-miRNA'lar, bu epigenetik mekanizmada yer alan enzimleri baskılayan yeni bir miRNA sınıfı olarak tanımlanmaktadır. İlk epi-miRNA, akciğer kanserinde gösterilen epi-miR-29 olmuştur. Buna rağmen bu düzenleyici epigenetik döngülerde yer alan deneysel olarak doğrulanmış epi-miR'lerin sayısı halen çok

azdır.

DNA metilasyonu epigenetik bir süreçtir. Ökaryotik genomlarda metilasyon işaretlerinin çoğu 5mC olarak ve genellikle CpG dinükleotidlerinde bulunur. DNA'nın metilasyonunu gerçekleştiren enzimler DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleridir ve metil vericisi olarak S-adenozil metionin'i kullanmaktadırlar. Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b ve DNMT3L olmak üzere 5 adet DNMT enzimi gösterilmiştir.

Fosfat ve tensin homolog gen (PTEN) 10. kromozom üzerinde bulunan, fosfoinozitol-3 kinaz (PI3K) yolunu regüle ederek büyüme ve hayatta kalmayı düzenleyen bir tumor baskılayıcı olarak keşfedilmiştir. PTEN'in çok işlevli bir tümör baskılayıcı olduğu ve PCa hastalarının yaklaşık %70'inde PTEN ifade kaybı olduğu bulunmuştur. PTEN kaybı insan prostat kanserlerinde NKX3.1 ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır. NKX3.1 geni 8. kromozom üzerinde bulunan bir tümör baskılayıcı gendir. Sporadik prostat kanserinden sorumlu tümör supresör genlerinin arasında bu iki gen yer alır ve sıklıkla değişime uğramaktadır.

Bu tez çalışmamızda lokal/ileri evre ve metastatik prostat kanserli hastalarda, her ikisi de epigenetik mekanizma olan epi-miRNA ve DNA metilasyonunun epigenetik etkileşiminin belirlenmesi, sonrasında bulduğumuz veriler ışığında seçtiğimiz 6 adet epi-miRNA (epi-miR-34b/c, 148a/152, 200a/b) ve hedef genleri olan DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN ve NKX3.1 genlerinin epigenetik etkileşimini saptamayı, her bir genin miRNA-mRNA düzenleyici etkileşim bağlantılarını belirlemeyi, tanısal ve prognostik öngörüdeki yerini bulmak amaçlanmıştır. Literatür taraması ile seçilen 30 adet epi-miRNA'nın klinikopatolojik (Gleason Skoru, PSA seviyeleri, TNM Evreleme) olarak ekspresyon seviyeleri real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Daha sonra ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunan 11 epi-miRNA'nın promoter metilasyon seviyeleri metilasyon spesifik PCR yöntemi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, miRNA'ların promoter bölgelerinde, PSA seviyeleri (miR-34b / c, miR-148a, miR-152), GS'ler (miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-148a, miR- 152, miR-185-5p) ve T evreleme (miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-140, miR-148a, miR-152, miR-185-5p) ile doğru orantılı artış gösteren hipometilasyon bulunmuştur. miR-200a/b klinikopatolojik parametrelere göre değerlendirildiğinde, lokal/lokal ileri PCa'da onko-miR,

metastatik aşamada tümör baskılayıcı miR olarak görev yapmaktadır. Sonraki aşamada regülasyonunda artış tespit ettiğimiz miR-34b, miR-34c, miR-148a, miR-152, miR-200a, miR-200b epi-miRNA'lar (miR-200a ve b metastatik evrede down-regüle olarak tanımlanmıştır) ile hedef genleri DNA Metiltransferazlar (DNMT1, 3a, 3b), PTEN ve NKX3.1'genlerinin “epi-miRNA-mRNA” düzenleyici ağındaki yeri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, miR-148a, miR-152 ve miR-200b'nin DNMT1'in ifadenmesini arttırıp, PTEN genini baskıladığı göstermiştir.

PCa'da aday miRNA biyomarker modellerinin değerlendirilebilmesi, klinikopatolojik değişkenlerin de hesaba katılmasıyla birlikte, PCa'nın tanısında doğruluğu daha da artıracaktır. Ayrıca, epigenomik düzeyde miRNA ekspresyonunun çalışılması, belirli bir kanser türü için en etkili tedavi yöntemlerini değerlendirmemizi sağlamakla birlikte, daha sonra da kanserin uzun vadeli öngörüsü ya da rekürsini belirleyebilmeye izin verebilecektir. miR-34b/c, miR-148a, miR-152 ve miR-200a/b epi-miRNA'ları ve onların hedef genleri olan DNMT'lar, PTEN ve NKX3.1'in prostat kanseri gelişiminde, lokal ve metastatik evredeki prognostik etkilerini olarak gösteren ilk epi-miR-epi hedef gen sinyal yolağı çalışmasıdır. Ayrıca, DNMT1-PTEN' ifadenmelerini hedef alan miR-148a, miR-152, miR-200b'nin güçlü ve ayırt edici birer biyomarker aday ve özellikle ileri evre prostat kanserinde prediktif, prognostik ve terapötik hedef olabileceğini göstermiştir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen veriler, PCa'nın metastatik yönetiminde epi-miRNA-mRNA çift yönlü geri beslenme döngüsüne ve anti-kanser terapötiklerinde metilasyon örüntüsüne dikkat çekmiştir. PCa'da tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak miRNA'ların ve metilasyon sürecinin ve bu süreçte yer alan genlerin mRNA, metilasyon ve miRNA ifade profillerinin bütünleştirici analizine dikkat çekmesi açısından yeni, öncü ve önemli bir tez çalışmasıdır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, en basit tanımla hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıdır. Bölgesel olabileceği gibi, metastaz yaparak uzak organlara da taşınabilmektedir. Kanser, 20. yüzyılın en korkulan hastalıklarından biri olmuş ve 21. yüzyılda da hem süreklilik göstererek hem de artan insidansla daha da korkutucu hale gelmiştir [1]. Normal biyolojik süreçte normal hücresel fonksiyonları kontrol eden genlerin etkileri desteklenirken, bu etkileri baskılayan genlerin etkileri ise ortadan kaldırılır [2].

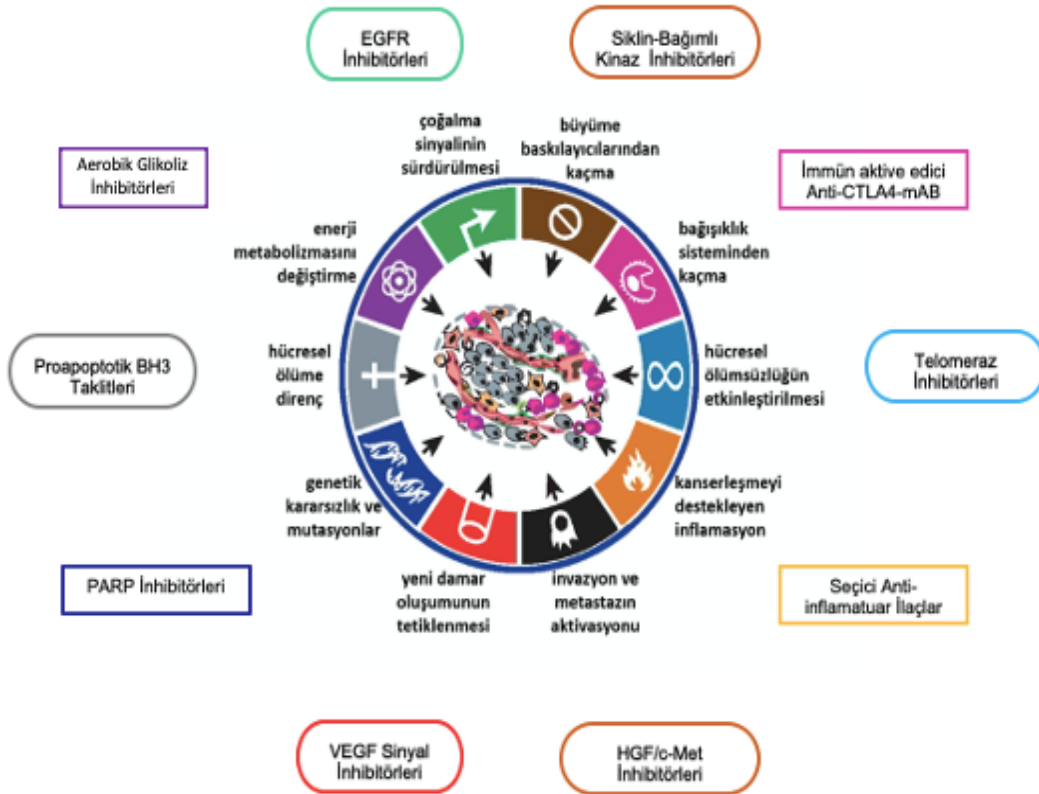
Kanser, hücresel DNA'daki bilgi akışı bozulduğunda ortaya çıkan ve anormal gen ekspresyonuna yol açan genetik bir hastalıktır ve çok aşamalı bir süreçten oluşur. Son zamanlarda genetik değişikliklerin tek başına malignitenin başlamasını ve yayılmasını tam olarak açıklamadığı kabul edilmekte ve karsinogenezin, genetik ve epigenetik değişiklikleri içeren çok aşamalı bir süreç olduğu kabul edilmektedir [3]. Epigenetik olayların oynadığı önemli rol, kanser etiyojisine dair yapılan son çalışmalarda bize gösterilmiştir [4]. Epigenetik değişiklikler, sürecin merkezi olarak giderek daha fazla kabul görsede, değişimin ana mekanizması mutasyonların birikimidir [2].

Kanser hücrelerinde meydana gelen değişim, onkogen ve tümör baskılayıcı genler dahil pek çok gende düzensiz ekspresyon ile sonuçlanan mutasyonlara sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda yüzlerce genin ekspresyonunda farklılığa yol açar. Bu farklılıklar göz önüne alınarak yapılan ve kanser hücrelerinde belirli tek veya çok moleküler hedeflere yönelik “hedef” terapi yöntemleri ile tedavi seçenekleri sunulmaktadır [1].

Anormal gen ekspresyonu, kanser hücrelerinde meydana gelen biyolojik süreçlerde temel değişikliklere neden olur ve bu kanserin ayırt edici özellikleri olarak adlandırılır. [2, 5]. 2000 yılında Hanahan ve Weinberg, kanserin malign davranışlarını büyük ölçüde açıklayan altı temel değişikliği (büyüme faktöründeki bağımsızlık, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümünden kaçınma, anjiyogenez, replikatif potansiyeli sürdürme, invazyon/metastaz) tanımlamışlar,

2011'de de dört yeni özellik (enerji metabolizmasını yeniden programlama, immün baskılayıcılardan kaçma, genomik dengesizlik, tümör başlatıcı inflamasyon) ekleyerek güncellemişlerdir (**Şekil 2.1**) [2, 5, 6].

Birçok ilaç sınıfı kanserin hedeflenen özellikleriyle bağlantılı bulunmuş fakat birçoğunun yalnızca sınırlı bir süre için veya sınırlı ortamlar içinde etkili olduğu gösterilmiştir [5, 7].



Şekil 2. 1. Kanser hücrelerinin on temel özelliği [5]

2.2. Prostat Anatomisi

Prostat bezi, kestane boyutunda olan ve mesanenin hemen altında, rektumun önünde yer alan bir salgı bezidir. Yalnızca erkeklerde bulunur. Görevi, boşaltım esnasında idrar torbasından idrarı taşımak ve ejakülasyon esnasında spermin iletimini sağlamaktır. Ayrıca spermleri besleyen ve onları koruyan özel bir protein salgılar. PSA, prostat epitel hücrelerinin ürettiği bir proteindir ve kanda düşük düzeyde bulunur. PCa'nde PSA'nın seviyesi genelde artmaktadır.

2.3. Prostat Kanseri

Tümör hücrelerinin hepsi kanser olarak ilerlemez. İyi huylu tümörler vücudun diğer bölgelerine yayılım yapmazlar [8]. İyi huylu prostat büyümesi [Benign prostat hiperplazisi (BPH)] prostatın kötü huylu olmayan büyümesi olarak adlandırılır [9]. Erken evrede asemptomatik olabilir ve genellikle yavaş seyrederek [10]. Kötü huylu büyüme ise prostat kanseri (prostat malign hiperplazisi) olarak adlandırılır. Prostatın malign hücrelere dönüşümü, prostatik intraepitelyal neoplazi (PIN) olarak başlayan, ardından lokal invazyonla birlikte lokalize prostat kanserine dönüşen ve sonrasında da, ileri prostat adenokarsinomu olarak devam eden ve metastatik prostat kanseriyle sonuçlanan çok aşamalı bir süreçtir [11].

Bireylerdeki kalıtsal yatkınlık, enflamasyon ve hücre çoğalması PCa'nın ilk basamağını oluşturur. Daha sonra proliferatif inflamatuvar atrofi (PIA) ve atipik küçük asiner proliferasyon (ASAP) lezyonlarına sebep olan bu başlatıcı faktörler, sonrasında, tümör süpresörlerin kaybı, onkogenlerin aktivasyonu ve hücredeki normal sinyal ileti sürecinin bozulması ile lokalize PCa'ya dönüşür. Bu lokal invazyon, migrasyon ile birlikte metastatik PCa'ya neden olur [12].

PCa, dünyada erkekler arasında en yaygın görülen ikinci kanserdir [13] ve Avrupa'da da son yirmi yılda hızla artan insidansı ile erkekler arasında en sık görülen kanser olarak ortaya çıkmıştır [14].

Son zamanlarda kaydedilen ilerlemelere rağmen, BPH'ye uygulanan gereksiz tedavi ve metastatik prostat kanserinin tedavisindeki yetersizlik nedeniyle, önemli bir tıbbi sorun olmaya devam etmektedir [11]. PCa, hem genetik hem de epigenetik faktörleri içeren multifaktöriyel bir hastalıktır [15] ve oldukça farklı sonuçlara neden olan heterojen bir yapıya sahiptir. PSA değerinin ölçümü ve rektal muayene, PCa'nın belirlenmesinin temel aşamasıdır [13]. PSA prostata özgüdür, ancak PCa'ya özgü değildir ve prostat ile ilgili diğer hastalıklarda da (prostatit, iyi huylu prostat hiperplazisi) düzeyi artabilmektedir [16]. Spesifikitesindeki limitasyon, PSA ile ilgili ana problemdir [17]. PSA düzeyinin, artan PCa'nın derecesi ve evresi ile doğrudan bir ilişkisi yoktur. Bu sebeple PCa'nın klinik yönetiminde daha güvenilir yeni prognostik ve diagnostik biyobelirteçlere büyük ihtiyaç duyulmaktadır [18-20].

2.4. Prostat Kanseri Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 2020 raporuna göre dünyada tüm yaş ve cinsiyette toplam 19 292 789 kanser teşhisi koyulan vaka sayısı bildirilmiştir. Bu sayı prostat kanserinde 1 414 259 vaka (%7,3) olarak açıklanmıştır. Türkiye de ise bu rakam 233 834 vaka içinde, prostat kanseri vaka sayısı 19 444 (%8,3) olarak yer almıştır. Ölüm oranları dünyada 9 958 133 ölüm içinde prostat kanseri ölüm oranı %3,8 (375 304) olarak, Türkiye’de ise toplamda 125 788 ölüm içinde prostat kanseri ölüm oranı %4,3 (5 464) olarak bildirilmiştir [21]. Bu veriler ile prostat kanseri dünyada erkekler arasında beşinci, Türkiye’de dördüncü sırada ölüm nedeni olmuştur.

2.5. Prostat Kanseri Biyoloji ve Genetiği

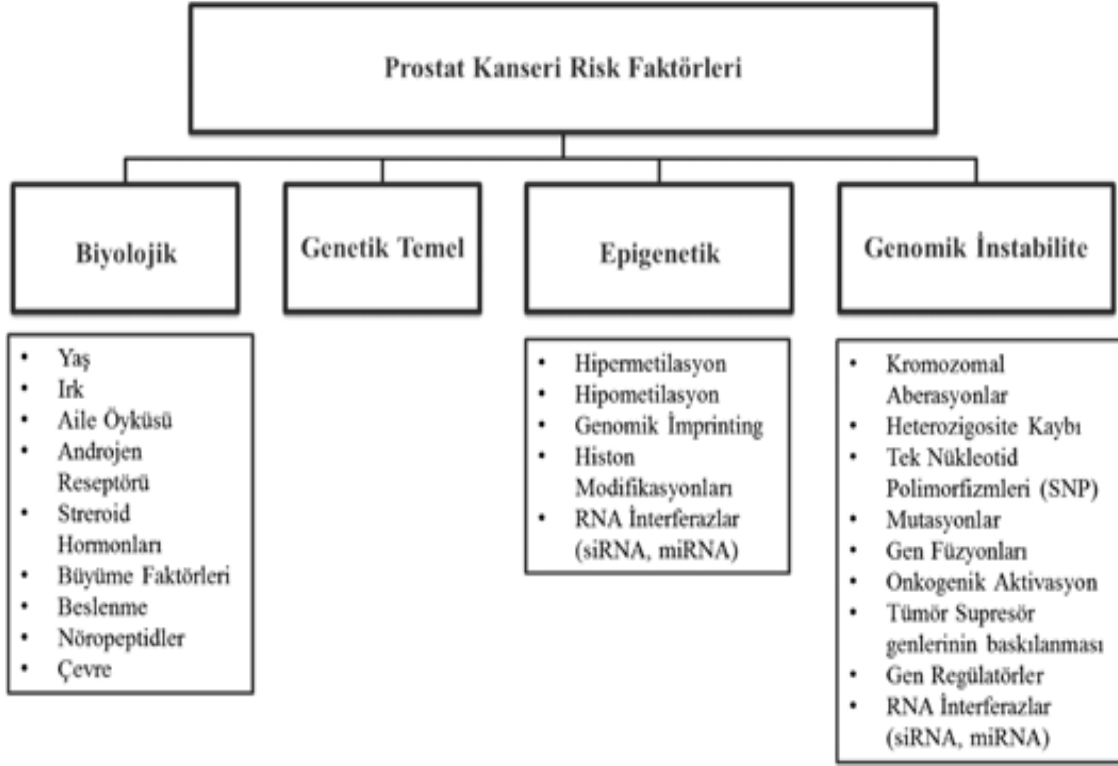
Prostat kanseri oranları ırk, etnik köken ve coğrafyaya göre önemli ölçüde değişiklik gösterir. Bu değişiklikler, PCa’nın tarama ve tedavisine erişimdeki çeşitlilik, prostat kanseri risk faktörlerine maruziyetteki farklılık ve prostat karsinogenezinin altında yatan biyolojideki farklılıklar ile açıklanabilmektedir.

PCa, tüm sık görülen kanser türlerinin içinde en fazla kalıtsal özellik gösteren türe sahiptir [22]. Prostat kanseri olan bazı hastaların, hastalıklarının kalıtsal bir temeli olduğu kabul edilmektedir. Bu durum hem ailesel hem de kalıtsal PCa tanımlarının, daha yaygın görülen sporadik tümörlerden ayrılmasına yol açmıştır. Bunun yanı sıra PCa insidansı, etnik köken ve çevresel faktörlere göre de değişiklik göstermektedir [23].

Prostat kanseri pek çok nedeni içinde barındıran heterojen bir kanser türüdür (**Şekil 2.2**). Bu heterojenlikte, hasta bazında tümör heterojenitesi, çok odaklı hastalık yani aynı hastanın aynı prostat dokusunda farklı tümörlerin bulunması, tümör içi hücresel heterojenite, mutasyonlar, gen füzyonlarını içeren genomik heterojenite, hücre popülasyonları arasındaki farklılık, epigenetik heterojenite ve tedaviye bağlı epigenetik değişim olasılığı akla gelmektedir [24]. Prostat kanserine neden olan üç ana kromozomal mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar; genetik yatkınlık genlerine sahip olma, onkojen amplifikasyonunu içeren somatik mutasyon ve tümör baskılayıcı

genlerin işlev kaybına neden olan somatik mutasyonlar olarak tanımlanmıştır [25].

Prostat kanserine katkı sağlayan moleküler yolların çoğu PCa'nın başlaması, ilerlemesi ve invazyonuna katkı sağlayan sporadik bir süreçtir ve tümör supresör ve onkogenler, bu sürecin ortaya çıkmasında ve androjenden bağımsız fenotiplerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır [12].



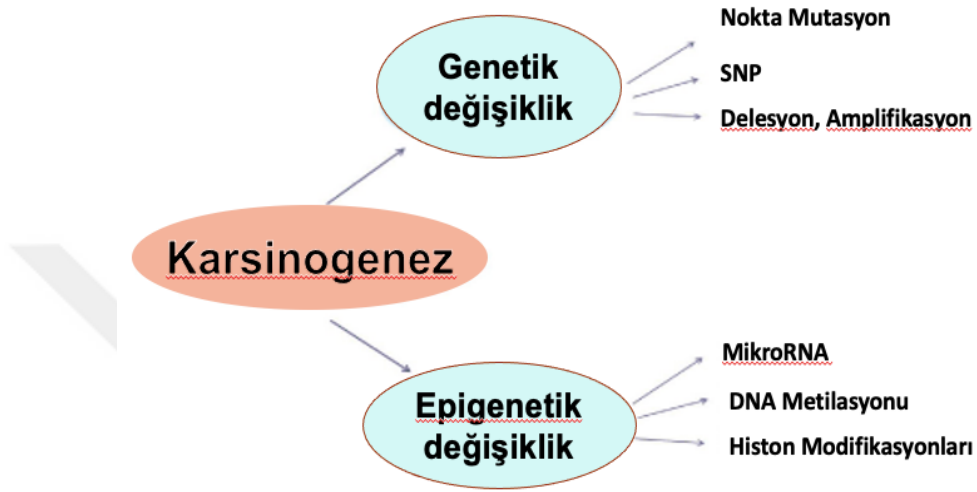
Şekil 2. 2. Prostat kanseri risk faktörleri [12]

2.6. Epigenetik

Tümöröjenez genetik ve epigenetik değişiklikleri içinde barındıran bir süreçtir. Genetik değişiklikler, genomik DNA baz dizisinde meydana gelen değişiklikler olarak tanımlanırken, epigenetik değişiklikler ise, genomik DNA baz dizisinde değişiklik oluşturmaz. Geri dönüşümlü oluşları ve DNA'nın baz dizisinde bir değişime neden olmamaları ile genetik değişikliklerden ayrılır (**Şekil 2.3**) [26]. Epigenetik

değişiklikler, genetik değişikliklerden önce, genellikle neoplastik dönemin erken aşamasında oluşur [27].

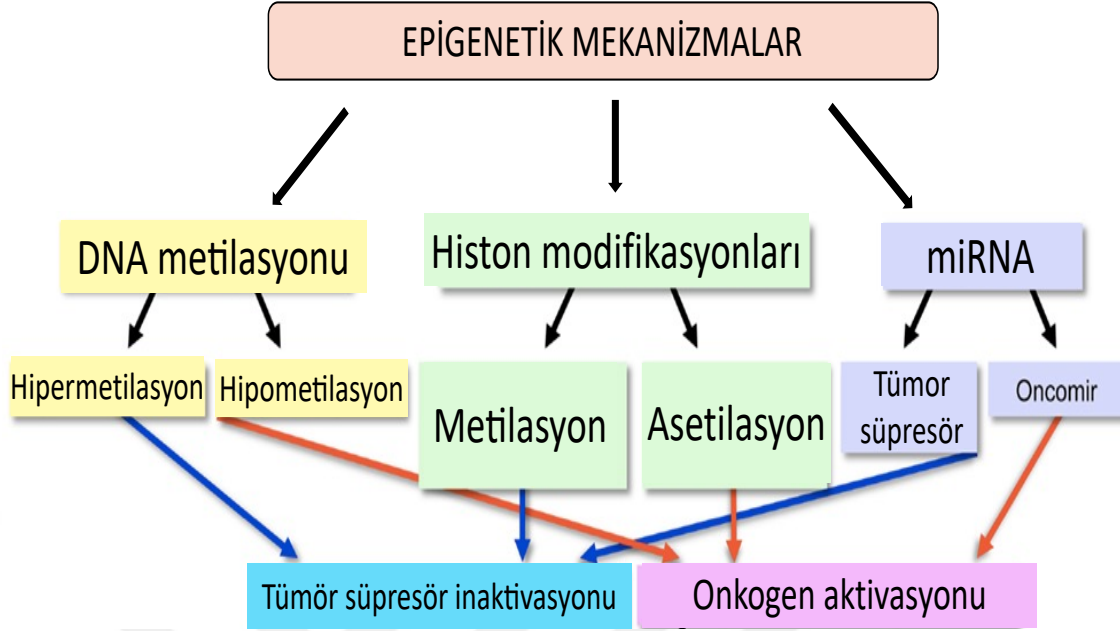
Epigenetik terimini ilk kullanan bilim insanı, Conrad Waddington olmuştur [28]. Conrad, epigenetiği "Genler ve ürünlerinin karşılıklı etkileşimlerini inceleyen ve fenotip oluşumunu sağlayan biyolojinin bir dalı" olarak tanımlamıştır [26, 29].



Şekil 2. 3. Tümörögenizde genetik ve epigenetik [26]

Bu terim, DNA dizisini değiştirmeden gen aktivitesini değiştirebilen ve bunu yeni hücrelere aktarabilen bir süreç olarak gelişmiştir. Epigenetik süreçte pek çok faktör rol oynar [30, 31]. Bu faktörler, en özet hali ile **Şekil 2.4**'de gösterilmiştir [32]. Epigenetik modifikasyonların başlatılması ve devam ettirilmesi için, DNA metilasyonu, RNA ilişkili susturma ve histon modifikasyonları olmak üzere temel olarak üç sistem kullanılır. Transkripsiyonel aşamada, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu, post-transkripsiyonel aşamada ise ncRNA'lar rol oynar [33, 34]. Günümüzde, epigenetik mekanizmada yer alan DNA ve histon proteinlerinin, kovalent olan ve kovalent olmayan modifikasyonlarını içeren ve bu modifikasyonların da genel kromatin yapısını etkilediği mekanizmaları açıklayan pek çok çalışma vardır [29]. Bu üç epigenetik mekanizma, genleri "kapatabilir" ve

"açabilir" özelliğindedir. DNA ve histon modifikasyonlarını içeren aracı mekanizmalar yazıcılar, siliciler ve okuyucular olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır [34].

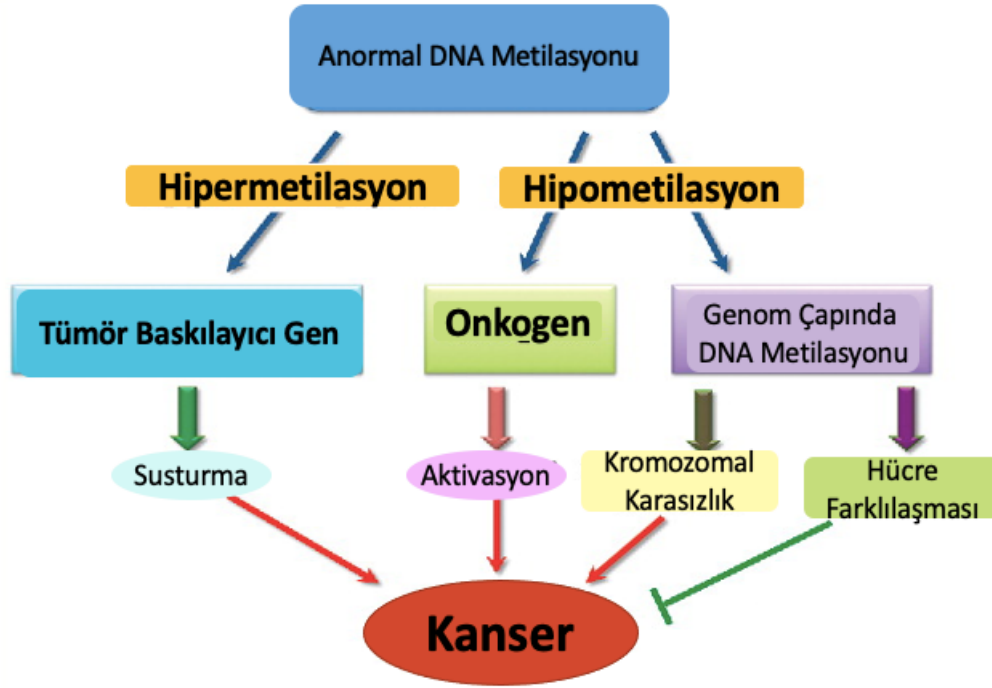


Şekil 2. 4. Epigenetik mekanizmalar [32]

2.6.1. Histon modifikasyonları

Ökaryotik hücrelerde çekirdek içerisinde bulunan DNA, histon ve histon olmayan proteinler tarafından oluşan ve kromatin adı verilen yoğunlaştırılmış yapı şeklinde düzenlenir. Kromatin 2 farklı formda bulunur; gevşek yapılanan ökromatin ve daha sıkı halde bulunan heterokromatin [35]. Histonlar, H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere beş sınıftır ve kromatinin birincil protein bileşenlerini oluşturmaktadır. H1 bağlayıcı histon, diğerler temel histonlardır. Nükleozomlar dört çekirdek histonun (H3, H4, H2A, H2B) bir oktamerinden oluşur ve kromatin yapının ana birimidirler. Bu birim etrafına 147 bç DNA'yı sarar. Bağlayıcı H1 histon ve histon olmayan kromatin proteinleri gibi diğer faktörlerin eklenmesi ile birlikte DNA'yı yaklaşık 200 bç bölebilmektedirler [36-38]. Bağlayıcı histonların N ve C terminal kuyrukları düzensiz olarak bulunur. Bu kuyruk kısımları çok sayıda lizin ve serin aminoasitinden oluşmaktadır [38]. N-terminal kuyruk kısımlarında post-translasyonel kovalent eklemeler ile meydana gelen, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon, sumolasyon, ADP ribozilasyon, deiminasyon, prolin izomerizasyonu ve yeni

anormallikler genellikle tümör baskılayıcı gen hipermetilasyonu, onkogen hipometilasyonu ve genomik instabilite gibi tümörle ilişkili genleri etkilemektedir. Bu genel olarak maligniteyi artıran, prognozu kötüleştiren ve tedavide karşılaşılan zorluğu daha da artıran bir durum ortaya çıkarır. DNMT genlerinin tümörler üzerindeki etkisi ve DNMT'ları hedefleyen terapötik yaklaşımlar halen tartışma konusudur [42]. DNMT inhibisyonu ile, tümör baskılayıcı genlerin artan ekspresyonu tümör oluşumunda azalmaya sebep olmuş ve böylece DNMT'ların kanser önleyici hedefler olarak kullanılabilir olma potansiyelini akla getirmiştir. Dahası, tümör oluşumunda anormal DNMT'ların moleküler rollerinin anlaşılması ile yeni ilaçların klinik olarak araştırması ve geliştirilmesi için teorik temeller atılmıştır [42]. DNA metilasyonundaki anormal süreç **Şekil 2.6'**de gösterilmiştir [43].

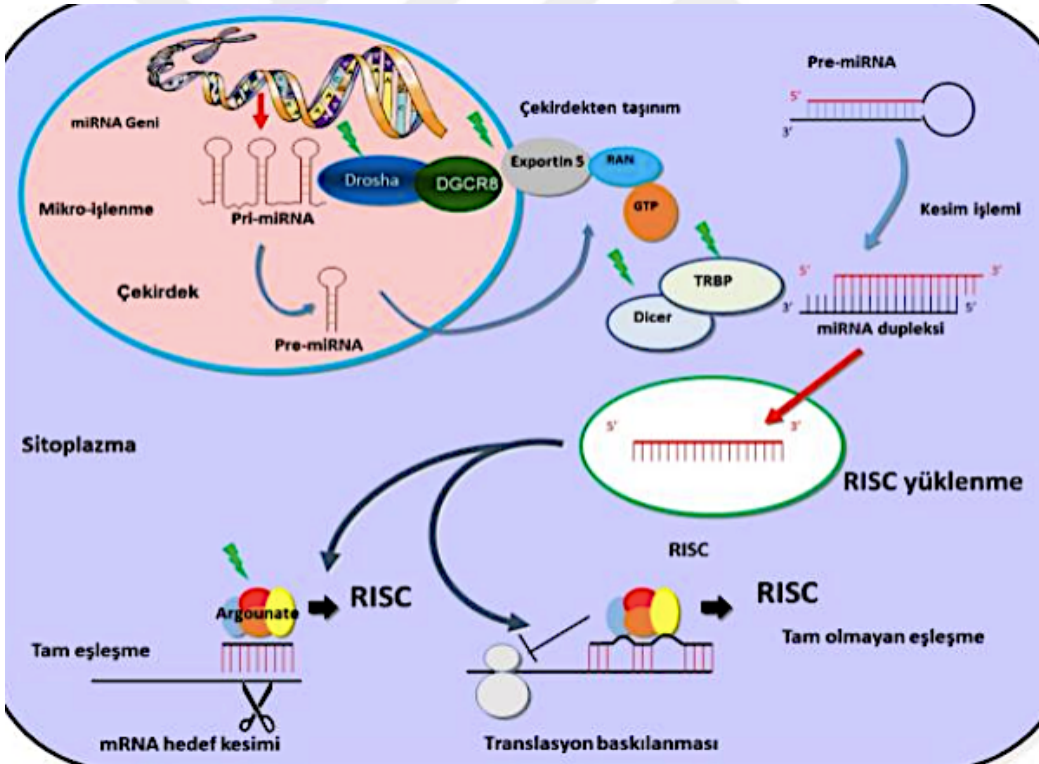


Şekil 2. 6. Kanser oluşumuna katkı sağlayan anormal DNA metilasyonu [43]

2.6.3. miRNA'lar ve epi-miRNA keşfi

miRNA'lar gen ifadesinin düzenleyicileri olarak post-transkripsiyonel aşamada işlev gören, yaklaşık 21-24 nükleotid uzunluğunda, ncRNA'lardır [19, 44]. Link-4 olarak 1993 yılında birbirinden bağımsız iki çalışma ile *Caenorhabditis Elegans*'da ilk keşfedilen miRNA, moleküler biyoloji alanında bir devrim yaratmıştır [45-48]. miRNA

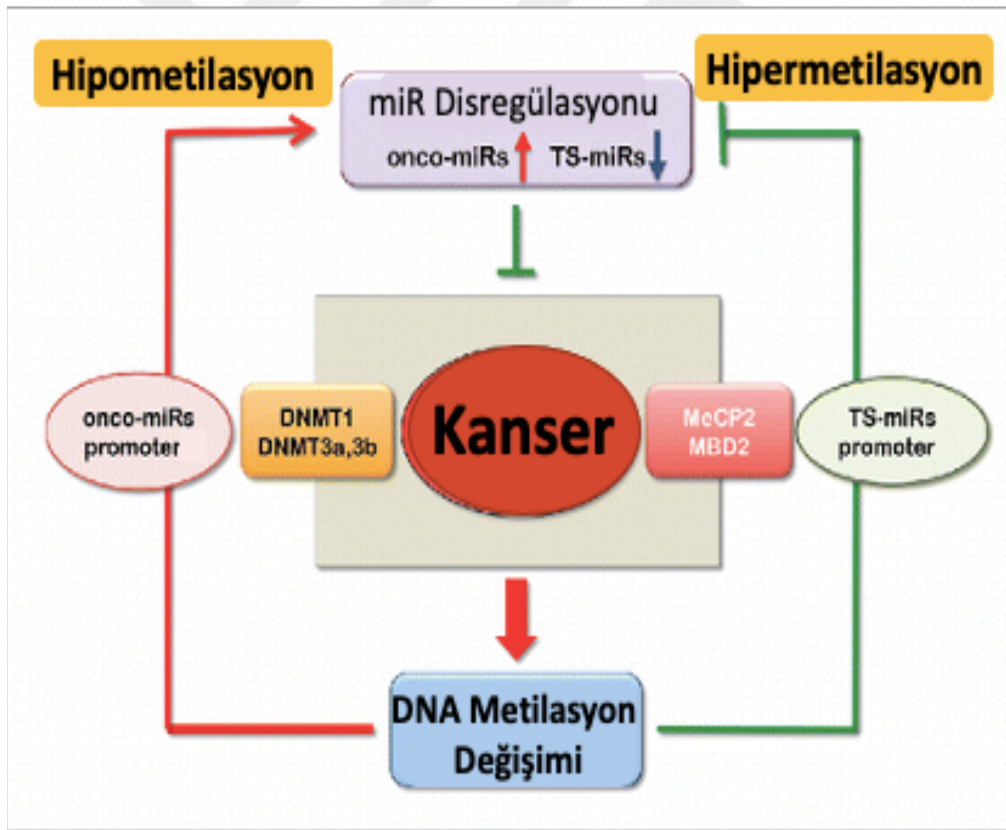
biyogenezi, miRNA geninden, çekirdekte pri-miRNA transkripti olarak başlatılır. pri-miRNA, mikro prekürsör kompleks adı verilen RNAaz III enzimi Drosha ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den (Pasha) oluşan kompleks tarafından yaklaşık (yaklaşık 65-75 nükleotid) kesilir ve prekürsör miRNA (pre-miRNA) meydana gelir. Pre-miRNA nükleustan nükleostoplazmik transporter Exportin-5 ile (Exportin5, RanGTP'ye bağlı şekilde) sitoplazmaya taşınır. Bir diğer RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından daha küçük (yaklaşık 22-24 nükleotid) dubleks miRNA'ya kesilir. Dublex miRNA gevşer ve olgun miRNA'yı oluşturmak için RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RISC) içinde toplanır [48, 49]. RISC kompleksi içerisinde yer alan bir RNAz olan argonaute etkisi ile 5' ucu daha kararlı olan kılavuz zincir seçilir. Daha sonra miRNA'lar, hedef mRNA'ya bağlanarak, mRNA ile komplementerlik sonucuna göre, mRNA parçalanır ya da translasyon durdurulur [19]. miRNA'ların biyogenezi, Şekil 2.7'de gösterilmiştir [50].



Şekil 2. 7. miRNA biyogenezi [50]

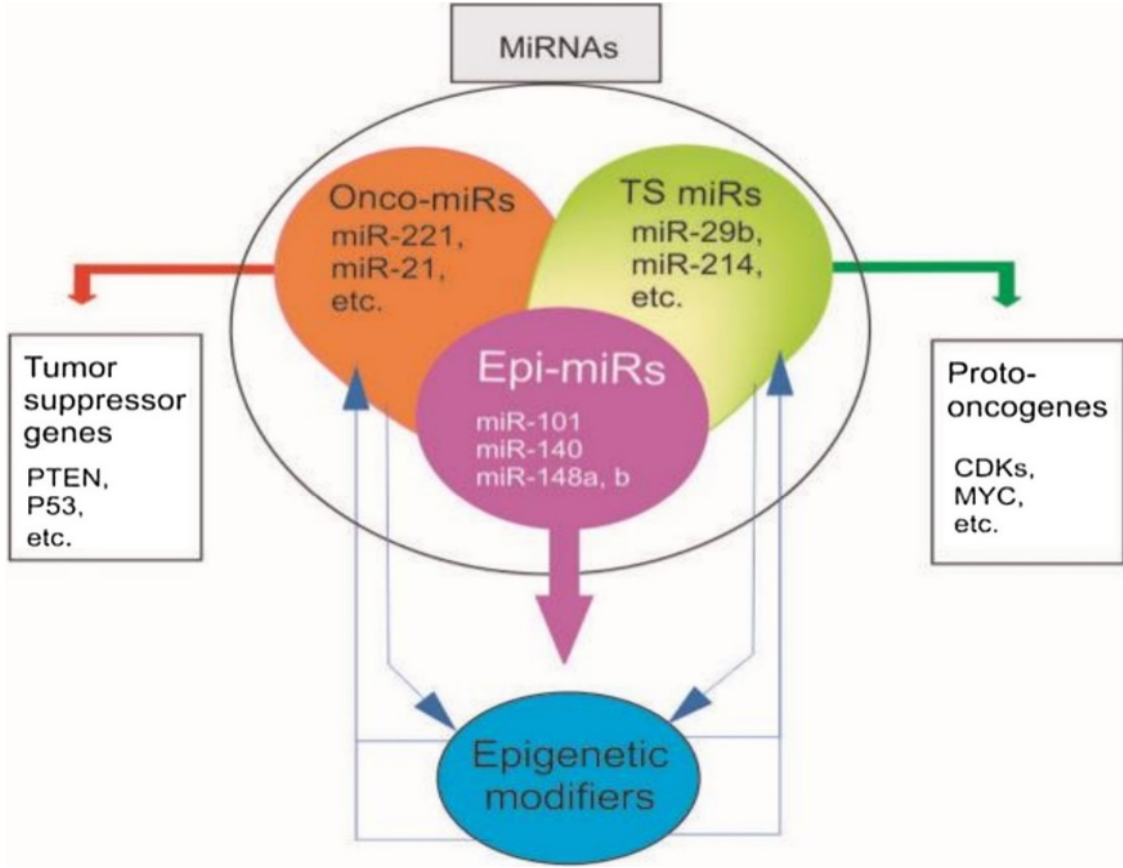
miRNA ifadelenmesindeki bozulma pek çok kanserde tanımlanmıştır [51]. Epigenetik mekanizma içerisinde yer alan miRNA'ların rolü, kanser araştırmalarındaki en ilginç yenilikler arasındadır [41]. miRNA'lar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi diğer epigenetik mekanizmaları da post-transkripsiyonel seviyede düzenleyebilmektedir [52]. Ayrıca, miRNA'lar hedef dışı etkileri azaltma ve kanser için geleneksel, hedefli veya bağışıklık temelli tedavileri tamamlama potansiyeline de sahiptir. miRNA'lar, klinik uygulamalarındaki birçok zorluğa rağmen, hesaplamalı modeller ve biyoteknolojinin ilerlemesiyle miRNA terapötiklerinin geliştirilmesinde, çeşitlendirilmesinde ve böylece kansere karşı ek tedaviler sunma potansiyeline de sahip olmuştur [53].

Epigenetik etkileşimler hem metilasyon hem de miRNA verileri entegre edilerek tespit edilebilen yeni prognostik biyobelirteçler adaylarıdır [54, 55]. miRNA ve DNA metilasyonu arasındaki epigenetik etkileşimler **Şekil 2. 8'** de gösterilmiştir.



Şekil 2. 8. miRNA ve DNA metilasyonu arasındaki epigenetik etkileşimler [43]

Epi-miRNA'lar, bu epigenetik mekanizmada yer alan enzimleri baskılayan yeni bir miRNA sınıfı olarak tanımlanmaktadır [55]. Bu miRNA'lar, DNMT'lar ve histon deasetilazlar (HDAC'lar) gibi epigenetik mekanizmanın anahtar araçları olan enzimleri doğrudan modüle edebilmektedir [56]. Epi-miR 29, akciğer kanserinde gösterilen ilk epi-miRNA'dır [55, 57, 58]. Ancak, bu düzenleyici epigenetik döngülerde yer alan deneysel olarak doğrulanmış epi-miR'lerin sayısı oldukça azdır [59]. Epigenetik değiştiriciler ve epi-miRNA'lar **Şekil 2. 9'** da özetlenmiştir [43].



Şekil 2. 9. Epigenetik değiştiriciler ve farklı miRNA türleri arasındaki düzenleyici yörünge [55]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Vorteks (Stuart scientific)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipet 10 µL (Gilson)
- Mikropipet 100 µL (Gilson)
- Mikropipet 200 µL (Gilson)
- Mikropipet 1000 µL (Gilson)
- Derin dondurucu (-20) (Dairei)
- Derin dondurucu (-86) (Sanyo)
- Buzdolabı (+4) (Sanyo)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 380)
- Santrifüj (Heraeus Biofuge 15)
- Spin vorteks (Biosan FV2400)
- Spektrofotometre (Berthold colibri LB 915)
- Spektrofotometre (Qubit, Thermo)
- Laminar kabin (Bioair, SAfflow 0.9)
- PCR cihazı (Qiagen Rotor Gene Q)
- Applied Biosystems 7500 Fast PCR cihazı
- PCR cihazı (Applied Biosystems Geneamp 9700)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- 1,5 mL Mikrosantrifüj Tüpü
- 10 µL Filtreli pipet ucu
- 100 µL Filtreli pipet ucu
- 200 µL Filtreli pipet ucu
- 1000 µL Filtreli pipet ucu
- 0,5 mL PCR tüpü

- 0,1 mL PCR tüpü
- Spor
- DNA saklama kutusu
- RNA saklama kutusu
- Pudrasız latex eldiven
- GRS 96 kuyulu PCR plate
- PCR tüpü sporu

3.1.3. Kullanılan kitler

- GeneAll Hybrid-R 100p miRNA izolasyon kiti
- WizScript cDNA Sentez Kiti (High Capacity)
- GeneAll SYBR GREEN Master Mix
- EZ DNA Metilasyon-Gold Kit
- GeneAll Blood-SV DNA İzolasyon Kiti
- Ampliqon 2x AmpMaster Hs-Taq
- Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit ve qiAzol
- Qiagen QuantiTect Reverse Transcription Kit
- Bioline SensiFAST SYBR No-ROX Kit

3.2. Yöntemler

3.2.1. Periferik kan örneklerinin toplanması

Çalışmamıza, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu (G.Ü.E.T-686) onayı ile topladığımız 25 kontrol, 25 prostat kanserli (PCa) ve 40 metastatik prostat kanserli (Met-PCa) hastalardan alınan kan örnekleri dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tam kan örnekleri Gazi Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Üroloji Klinikleri'ne başvuran hastalardan sağlanmıştır. Tüm hastalardan aydınlatılmış onam alınmıştır. Hastaların yaş aralıkları PCa için 54-70, metastatik olgular için 40-85 ve kontrol grubu için 41-59'dur. Bu çalışmadaki dahil olma kriterleri, tam kan örnekleri alınan hastaların herhangi bir terapi almamış olmaları ve cerrahi operasyon geçirmemiş olmalarıdır. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinikopatolojik

özellikleri **Çizelge 3.1.**'de gösterilmiştir. Bir hastanın kan örneği çalışmadığı için verilere dahil edilmemiştir.

Çizelge 3.1. Hastaların klinikopatolojik özellikleri

	PCa	Met-PCa
Tanı aldığındaki ilk PSA Düzeyi (ng mL⁻¹)	Hasta Sayısı	
<10	19	-
≥10	6	-
>20	-	30
≤20		9
Gleason Skor (GS)		
6	10	-
7	11	-
8	3	11
9	-	16
10	1	12
TNM Evreleme		
T2/N0/M0	15	-
T3/N0/M0	10	-
T3/N0/1M1		10
T3/4/N0/1M1	-	24
T4/N0/1M1	-	5

3.2.2. Kandan serum/plazma elde edilmesi

1. Kan alındıktan sonra maksimum 2 saat içerisinde işlemler tamamlandı.
2. Kan örneği alındıktan sonra en az 8-10 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.
3. Tüpler santrifüj edilmeden önce beklemiş ve kan hücreleri çökmeye başlamışsa en az 15-20 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı ve diğer adımlara geçildi.
4. Tüpler 500 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkarıldı ve yavaşça kapakları açıldı. En üst kısmından 200 µl'lik pipetlerle (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 4-5 kez pipetleme yaparak toplamda 1.000 µl olacak şekilde steril (DNase-RNase free) mikrosantrifüj tüplere toplandı.
6. Tüpler 2 000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonrası, yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne total hacmin %80'inene yakın ürün transfer edildi.
8. Bu şekilde ayrılan kan örnekleri (-20)°C ya da (-80)°C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. miRNA izolasyonu

Çalışmamızda 30 adet epi-miRNA'nın ifade düzeyi incelendi (**Çizelge 3.2**). miRNA izolasyonu, miRNA izolasyon kiti (GeneAll, South Korea) kullanılarak aşağıda verilen üretici talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen miRNA'lardan, çalışılan her bir miRNA'ya özgü stem-loop primerleri dizayn edildi.

1. 1,5 mL'lik tüp içerisinde 200 µL serum ve 500 µL kit içerisinde yer alan RiboEx karıştırılarak pipetaj yapıldı.
2. 5 dk oda ısısında inkübe edildi. 1,5 mL'lik tüp üzerine 100 µL kloroform eklendi ve alt üst yapıldı. 2 dk oda ısısında bekletildi.
3. 12 000 rpm'de 10 dk 4°C'de santrifüj yapıldı ve sulu faz başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
4. Alınan sulu faz kadar üzerine %50 etanol eklendi. Pipetaj yapıldı. Elde edilen mix, tip B kırmızı kapaklı kolona aktarıldı.
5. 11 000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Altta kalan tüpün üzerine kalan sıvının hacmi kadar saf etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Karışım (yaklaşık 650 µL) tip W kolona aktarıldı.
6. 11 000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µL RBW Buffer eklendi.
7. 11 000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µL RNW Buffer eklendi.
8. 11 000 rpm'de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve tekrar 500 µL RNW Buffer eklendi.
9. 11 000 rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine hiçbir şey eklenmeden 11 000 rpm'de 2 dk santrifüj

edildi.

10. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50 µL RNase-free su eklendi. 2 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 11 000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Elde edilen numune (-20)°C de çalışılana kadar muhafaza edildi.

Çizelge 3.2. Çalışılan epi-miRNA'ların listesi

No	Epi-miRNA	No	Epi-miRNA	No	Epi-miRNA
1	21	11	101-1	21	185-5p
2	26a-1	12	101-2	22	200a
3	26a-2	13	124	23	200b
4	26b	14	126	24	200c
5	29a	15	140	25	221
6	29b	16	143	26	222
7	29c	17	145	27	217
8	34a	18	148a	28	301
9	34b	19	148b	29	342
10	34c	20	152	30	506

3.2.4. Primerlerin tasarımı

Kullanılan tüm forward ve reverse primerlerinin dizaynı, daha önceden yayınlanmış olan literatür çalışmaları taranarak ve miRbase, primer dizayn gibi veri tabanlarından yararlanarak yapılmıştır.

3.2.5. cDNA eldesi ve fluorimetrik ölçüm

cDNA eldesi, cDNA sentez kiti (Wizbio, South Korea) kullanılarak üretici firmanın belirttiği talimatlara göre gerçekleştirildi ve elde edilen cDNA'lara SYBR Green temelli Real-time PCR (RT-PCR) yöntemi uygulandı.

- Her bir PCR tüpü için 2 µL reaction buffer (10x), 2 µL stem-loop primer, 1 µL dNTP mix (20X), 10 µL miRNA, 1 µL WizScript RTase, 0.5 µL RNase Inhibitor, 3.5 µL RNase-free su ile toplam hacim 20 µL olacak şekilde karıştırılarak mix hazırlandı.
- Thermal cycler cihazında 25°C 10 dk, 37°C 120 dk, 85°C 5 dk cDNA sentezi

sağlandı.

3. Elde edilen cDNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonları Qubit cihazı ile (Thermo, USA) ölçüldü ve RT-qPCR'da reaksiyona girmesi gereken örnek konsantrasyonu 100 ng/ul olarak ayarlandı.

3.2.5. miRNA kantitatif real time PCR yöntemi (RT-qPCR)

Her bir örnek başına kullanacağımız cDNA'dan 1 µL, kit içerisinde yer alan SYBR Green master mix 10 µL (2X) (GeneAll, South Korea), forward primer F 1 µL (10pM), reverse R primer 1 µL (10pM), 1 µL ROX, 6 µL su karıştırılarak bir mix hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu mix PCR tüplerine dağıtılarak, Başlangıç denatürasyonu 95°C 10 dk, denatürasyon 95°C'de 15 sn ve bağlanma-uzama, 60°C'de 1 dk (40 döngü) olacak şekilde (7500 fast RT-PCR sistem Applied Biosystems, USA) qPCR işlemi uygulandı. Deneyler 3 tekrar olarak yapıldı. Housekeeping gen olarak U6 genine özgü primerler kullanıldı. RNA-U6, küçük nükleer RNA aile üyesi arasındadır ve miRNA kantifikasyon çalışmalarında referans gen olarak kullanılır. RT-qPCR sonucunda elde edilen Ct (cycle threshold) değerleri $2^{-\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplandı. Katsayı değişimi (FC-Fold change) kontrol grubuna göre değerlendirildi.

3.2.6. Metilasyon PCR primer dizaynı

Ekspresyon seviyesi yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan epi-miRNA'lar arasından seçtiğimiz 11 adet epi-miRNA'nın promotör metilasyon düzeyini belirlemek için dizayn edilen primer listesi **Çizelge 3.3**'te verilmiştir. Epi-miR-34b ve 34c, epi-miR-200a ve 200b aynı promotör bölgesine sahip olduklarından birlikte ele alınmıştır.

Çizelge 3.3. Kantitatif metilasyon spesifik PCR primerleri

miRNA metilasyon spesifik PCR (MSP) primer listesi			
No	Bölge	Forward	Reverse
1	34a	5'-TCCTTCCTACTCGTACCACCAAA-3'	5'-AGGTGGAGGAGATGTCGTTGTT-3'
2	34b/c	5'-TTTAGTTACGCGTGTGTGC-3'	5'-ACTACAACTCCCGAACGATC-3'
3	101-2	5'-GATTGGTAATTTTCGCGTC-3'	5'-GCGCTACCATTAATCCGTA-3'
4	126	5'-TTGGCGGTCGGGTTTGGTC-3'	5'-TAAACCCCGCGACGAACG-3'
5	140	5'-TGTTTGGGGTTAGTAAAATTGTAAC-3'	5'-AAAATCTCGAACGAAAAAATCG-3'
6	148a	5'-TAGGGGAGGTTTCGTAAAGC-3'	5'-CACGAAAACGAATATTGAAA-3'
7	152	5'-GGGTTAGGGGGAGTAGTTAATTTAG-3'	5'-ATAAACTCCAAAAACATACCCATCA-3'
8	185-5p	5'-TTTTTTTGTAGAGTTGGTTAATTCG-3'	5'-ATCACCATATCTTAATCTAAACGCA-3'
9	200a/b	5'-TGGGAGTTTAGGGGATATATTG-3'	5'-TCTACCTCAACCAAAATCAAACC-3'
10	Aktin	5'-GGGTGGTGATGGAGGAGGTT-3'	5'-TAACCACCACCAACACACAAT-3'

3.2.7. DNA izolasyonu

İstatistiksel olarak anlamlı bulduğumuz 11 adet epi-miRNA (epi-miR-34a, 34b/c, 101-2, 126, 140, 148a, 152, 185-5p, 200a/b) için hastaların periferal total kan örneklerinden DNA izolasyon kiti (GeneAil, South Korea) kullanılarak ve aşağıda yer alan üretici talimatları doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

1. 1,5 mL' lik tüp içerisine 20 µL Proteinaz K ve üzerine 250 µL kan eklendi.
2. Daha sonra 200 µL kit içerisinde yer alan BL Buffer eklenip, vorteks ve spin yapılarak 56°C'de 10 dk inkübe edildi.
3. 200 µL saf etanol eklendi. Vorteks ve spin yapıldı.
4. Hazırlanan mix kolon tüpe aktarıldı ve 10 000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
5. 600 µL BW Buffer eklenip, 10 000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
6. 700 µL TW Buffer eklenip, 10 000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
7. Tüplere herhangi bir şey eklenmeden tekrar boş olarak 14 000xg 'de 2 dk santrifüj edildi.
8. Kolon 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpü içerisine alınıp, 60 µL AE Buffer eklendi. Tam hızda (14 000xg) 2 dk santrifüj yapıldı.

9. DNA örnekleri kullanılabildiği kadar (-20)°C'de muhafaza edildi.

3.2.8. Bisülfid modifikasyon yöntemi

Örneklerin Qubit cihazı (Thermo, USA) ile DNA saflık ve konsantrasyonları ölçüldü ve bisülfid modifikasyon-DNA metilasyon kiti kullanılarak (Zymo research, CA) üreticinin talimatları doğrultusunda deney gerçekleştirildi.

1. 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüplerde bulunan DNA örneklerinin üzerine 5 µL kit içerisindeki M-Dilution Buffer eklendi ve distile su ile total hacim 50 µL'ye tamamlandı. Hafif pipetaj yapıldı.
2. Örnekler 37 °C' de 15 dk inkübe edildi.
3. 15 dk'lık inkübasyon süresinden sonra her bir örneğe CT-Conversion Reagent eklendi ve hafifçe vortekslendi.
4. Örnekler ışık almayan bir ortamda 50 °C'de 12-16 saat tekrar inkübe edildi.
5. Daha sonra 10 dk buz üzerine alındı.
6. 400 µL M-Binding Buffer eklendi ve pipetaj yapıldı.
7. Örnekler Zymo-Spin I kolona yüklendi ve kolon 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
8. 15-30 sn hızlıca santrifüj edildi (≥10 000g) ve toplama tüpte biriken sıvı boşaltıldı.
9. 200 µL M-Wash Buffer eklendi. 15-30 sn hızlıca spin yapıldı.
10. 200 µL M-Desulphonation Buffer eklendi ve kolonlar 15 dk oda sıcaklığında bekletildi (20-30 °C).
11. Inkübasyondan sonra 15-30 sn hızlıca spin yapıldı.
12. 200 µL M-Wash Buffer eklendi. 15-30 sn hızlıca spin yapıldı. Daha sonra yeniden 200 µL M-Wash Buffer eklendi ve 30 sn spin yapıldı.
13. Kolon matriksine doğrudan 50 µL M-Elution Buffer eklendi ve kolon 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpü tüpe yerleştirildi. Kısa bir spin ile DNA elue edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.

3.2.9. Kantitatif metilasyon real time PCR yöntemi (MS-qPCR)

Bisülfid dönüşümü yapılan örneklerden, örnek başına 4 µL DNA (<500ng), 10 µL (2X) SYBR Green master mix (Wizbio, South Korea), 1µL forward primer (10pm), 1µL reverse primer (10pm), 1µL ROX (1x), 3µL su karıştırılarak bir mix hazırlandı. Bu mix PCR tüplerine dağıtılarak, Başlangıç denatürasyon 95°C 10 dk, denatürasyon 95°C'de 15 sn ve bağlanma-uzama 60°C'de 1 dk (x40 döngü) olacak şekilde (7500 fast RT-PCR sistem Applied Biosystems, USA) qPCR uygulandı. Housekeeping gen olarak aktin geni kullanıldı.

3.2.10. RNA izolasyonu

Kan örnekleri oda sıcaklığına getirilerek RNA izolasyon kiti (miRNeasy Serum/Plasma Kit, Qiagen, GERMANY) içerisinde yer alan üretici talimatları uygulanarak, aşağıda belirtilen aşamalar takip edildi.

1. 200 µL serum ve 1/5'i kadar kit içeriğindeki qiazol lysis reagent karıştırıldı. Vortex yapılarak 5 dk oda ısısında bekletildi.
2. 200 µL kloroform eklendi ve 15 sn vortex yapıldı. 2-3 dk bekletildi. 12 000xg +4°C'de 15 dk santrifüj edildi.
3. En üstteki faz (RNA içeren) başka bir tüpe alınarak (yaklaşık 600 µL) üzerine 1,5 katı kadar saf etanol eklendi.
4. Pipetaj yapılarak, kit içerisinde bulunan 2 mL'lik toplama tüpündeki RNeasy MinElute spin kolona pipetlendi.
5. 8000xg'de 15sn oda ısısında santrifüj edildi.
6. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
7. 700 µL yıkama tamponu RWT eklendi. 8000xg'de 15sn oda ısısında santrifüj edildi
8. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
9. 500 µL kadar bir diğer yıkama tamponu RPE eklendi ve 8000xg'de 15sn oda ısısında santrifüj edildi.
10. Spin kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi. 500µL %80 etanol eklendi ve 8000xg'de 2dk oda ısısında santrifüj edildi.

11. Santrifüjlemeden sonra, spin kolonun toplama tüpünün altında kalan akışla temas etmemesine dikkat edilerek RNeasy MinElute spin kolon çıkartılıp yeni toplama tüpüne yerleştirildi.
12. 5dk tam hız (14 000xg) spin kolonun kapağı açık santrifüj edilerek etanolden uzaklaştırılıp membran kurutuldu.
13. Kurutulan spin kolon yeni 1,5 mL toplama tüpüne aktarılıp üzerine 14 µL RNase-free eklendi ve yine tam hız 1 dk santrifüj edildi.
14. Çalışılana kadar örnekler (-20) °C'de muhafaza edildi.

3.2.11. cDNA eldesi ve fluorimetrik ölçüm

Elde edilen RNA'ların spektrofotometrik yöntemler ile (Berthold, LB915 Colibri) saflık ve konsantasyonları ölçüldü. cDNA sentez kitinin (QuantiNova reverse transkripsiyon kit, Qiagen, GERMANY) içerisinde yer alan üretici protokolüne göre aşağıdaki basamaklar takip edildi. Reaksiyona girmesi gereken örnek konsantrasyonu 100 ng/ul olarak ayarlandı.

1. Total RNA ve su toplam 13 µL olacak şekilde hazırlandı.
2. 2 µL qDNA removal mix eklenerek total son hacim 15 µL yapıldı.
3. Thermal cycler cihazında, 45°C'de 2'şer dk bekletildikten sonra cihaz durdurularak örnekler buza alındı.
4. Sonrasında her bir tüp içerisine reverse transkripsiyon master mix 4 µL, revers transkripsiyon enzim 1 µL eklenerek son hacim 20 µL'ye tamamlandı.
5. Tüpler Thermal Cycler cihazına tekrar yerleştirilerek, 25 °C'de 3 dk, 45 °C'de 10 dk ve 85 °C'de 5 dk olacak şekilde ayarlanarak cDNA elde edildi.

3.2.12. mRNA kantitatif real time PCR yöntemi

Çalışmamızda bir referans gen ile birlikte toplam 6 gende ekspresyon seviyesinin tespiti yapıldı. Kullanılan primerler **Çizelge 3.4.**'de verildi. Üreticinin talimatları doğrultusunda aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. Her bir örnek için, 5,5 µL su, her bir primer çiftinden (reverse-forward) 0.8 µL, SYBR Green master mix (Bioline sensiFAST SYBR 2x, Australia) 10 µL olacak şekilde toplamda 15 µL mix hazırlandı.
2. 5 µL cDNA eklenerek son hacim 20 µL'ye tamamlandı.
3. Başlangıç denatürasyonu 95°C 2 dk, denatürasyon 95°C'de 5 sn, bağlanma 61°C'de 30 sn ve uzama 72°C'de 5 sn (40 döngü) olacak şekilde (Qiegen Rotor-Gene-Q) qPCR uygulandı.
4. Deneyler 3 tekrar olarak yapıldı. Housekeeping gen olarak aktin geni kullanıldı.

Çizelge 3.4. Kantitatif mRNA PCR Primerleri

Gen ekspresyonunda kullanılan primer listesi			
No	Gen	Forward	Reverse
1	AKTİN	5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT-3'	5'-ACTCGTCATACTCCTGCTT-3'
2	DNMT1	5'-ACCACCATCACATCTCATT -3'	5'-GTCTAGCAACTCGTTCTCT-3'
3	DNMT3a	5'-CGGAACATTGAGGACATCT-3'	5'-GTACTGGTACGCACACTC-3'
4	DNMT3b	5'-GAAGATCAGAGCCGAGAACAA -3'	5'-TCAAAGAGAGGGTGAAGGA-3'
5	PTEN	5'-TTAGACTTGACCTATATTTATCCA-3'	5'-GCGGTGTCATAATGTCTT -3'
6	NKX3.1	5'-AGAGACCGAGCCAGAAAGG-3'	5'-GCTTCTGCGGCTGCTTAG -3'

3.2.13. İstatistiksel analiz

Değişkenler SPSS Statistics 21.0 kullanılarak işlendi ve analiz edildi. Hasta grupları miRNA ekspresyon düzeyi ile klinikopatolojik parametreler (Gleason Skoru, PSA seviyeleri, T-evreleme) arasındaki korelasyonu incelemek için Bonferroni düzeltmeli Mann – Whitney-U ve Kruskal – Wallis testleri yapıldı. P <0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Gruplar arası mRNA ekspresyon düzeyi SPSS 22.0 programı kullanılarak Kruskal Wallis-H testi ile analiz edildi. Bu işlemin ardından Kruskal Wallis-H sonrası belirlenen anlamlı farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere tamamlayıcı karşılaştırma tekniği post-hoc Tamhane's T2 uygulandı. Hasta grupları ile klinikopatolojik parametreler (Gleason Skoru, PSA düzeyi, TNM-evreleme) arasındaki korelasyonu incelemek için multinominal lojistik regresyon analizi; epi-

miRNA'lar ve hedef genler arasındaki ilişkiyi bulmak için ise lineer regresyon analizi yapıldı. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda prostat kanseri teşhisi konmuş hastalardan kan örnekleri toplanarak 30 adet epi-miRNA ekspresyon seviyesi araştırılmış, sonucunda ilk PSA seviyesi ile arasındaki korelasyon incelenmiştir. Bulgularımızda, çalıştığımız epi-miR'lerden epi-miR-26a-1, miR-140, miR-145-5p, miR-506'nın ekspresyon seviyeleri ile hasta gruplarımız arasında (Kontrol, PCa ve Met-PCa) istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$). PSA seviyesi 10 ve daha büyük olan grubumuzda bulunan (≥ 10) hastalarda epi-miRNA ekspresyon seviyelerinin; epi-miR-21'de 6 kat, miR-26a-2'de 8 kat, miR-26b'de 10 kat, miR-29a'de 5 kat, miR-29c'de 106 kat, miR-34a-5p'de 9 kat, miR-34b'de 7 kat, miR-34c'de 24 kat, miR-101-1'de 136 kat, miR-101-2'de 5 kat, miR-143'de 17 kat, miR-148a'da 107 kat, miR-148b'de 20 kat, miR-152'de 5 kat, miR-185-5p'de 33 kat, miR-200a'da 4 kat, miR-200b'de 20 kat, miR-200c'de 6 kat, miR-217'de 4 kat, miR-221'de 5 kat, miR-222'de 34 kat, miR-301'de 4 kat olmak üzere kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdiğini bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**). Çalışmaya dahil edilen hastaların tüm PSA seviyelerinde [10 ve daha büyük olan (≥ 10) ve 10'dan küçük olan (<10)] epi-miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-34a-5p, miR-34b, miR-34c, miR-101-1, miR-143, miR-148a, miR-148b, miR-152, miR-185-5p, miR-200b, miR-221, miR-222'nin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**).

Met-PCa'lı olan ve PSA düzeyi 20'den büyük (>20) olan hastalarımızda epi-miR-21'de 22 kat, miR-26a-2'de 22 kat, miR-26b'de 9 kat, miR-29a'de 4 kat, miR-29b'de 3 kat, miR-29c'de 26 kat, miR-34a-5p'de 10 kat, miR-34b'de 11 kat, miR-34c'de 22 kat, miR-101-1'de 4 kat, miR-101-2'de 3 kat, miR-124'de 7 kat, miR-126'de 4 kat, miR-143'de 21 kat, miR-148a'da 76 kat, miR-148b'de 7 kat, miR-152'de 59 kat, miR-185-5p'de 60 kat, miR-200a'de 2 kat, miR-200b'de 3 kat, miR-200c'de 9 kat, miR-217'de 6 kat, miR-221'de 17 kat, miR-222'de 26 kat, miR-301'de 5 kat ve de miR-342'de 4 kat olmak üzere ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı arttığını bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**). PSA seviyesi 20 ve daha küçük olan (≤ 20) ve PSA düzeyi 20'den büyük (>20) olan Met-PCa'lı hastalarımızda, epi-miR-21, miR-26a-2, miR-26b, miR-29c, miR-34a-5p, miR-34b, miR-34c, miR-124, miR-126, miR-143, miR-148a, miR-148b, miR-152, miR-185-5p,

miR-200a, miR-200c, miR-217, miR-221, miR-222 ve miR-342'nin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artışlar bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**).

Her iki gruptaki (PCa ve Met-PCa) PCa'lı hastalarımızda epi-miR-21, miR-26b, miR-29c, miR-34a-5p, miR-34b, miR-34c, miR-143, miR-148a, miR-148b, miR-152, miR185-5p, miR-221, miR-222 epi-miRNA'larındaki kademeli artışları istatistiksel olarak anlamlı bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**). Bulduğumuz bu sonuç, bize bu miRNA'ların prostat kanserinin prognozunda biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini gösterdi.

Çalışılan epi-miRNA'lardan ekspresyon seviyelerinde önemli artış bulduğumuz 11 adet epi-miRNA'nın promotor metilasyon seviyelerinde meydana gelen değişikliği PSA seviyesi 10 ve daha büyük (≥ 10) olan hastalarımızla ilişkilendirdiğimizde, epi-miR-152 ve epi-miR-200a/b'nin promotor metilasyon yüzdelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde istatistiksel olarak azaldığını bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**). Bu sonuç bize bu iki epi-miR'in (yani onko-miRNA) promotor bölgelerinin PCa'lı olan hastalarda hipometile olduğunu gösterdi.

PSA seviyesi 10'dan küçük (<10) olan hastalarımızda, epi-miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-140, miR-148a ve miR-200a/b'nin de bununla benzer şekilde promotor metilasyon yüzdelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde istatistiksel olarak azaldığını bulduk ($p<0.05$).

Met-PCa grubunda bulunan tüm hastalarımızda ($PSA \leq 20$ ve $PSA > 20$), epi-miR-34b/c ve miR-148a'nın promotor metilasyon yüzdelerinin kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde istatistiksel olarak azaldığını bulduk ($p<0.05$). Epi-miR-140 ve miR-200a/b'nin promotor metilasyon yüzdelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulduk. Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bu sonuç ile bu iki epi-miR'in promotor bölgelerinin hipermetile olduğunu bize gösterdi (yani tümör baskılayıcı epi-miRNA) ($p<0.05$) (**Çizelge 3.5**). Ekspresyon seviyeleri ile promotor metilasyon yüzdelerinin birlikte değerlendirilmesi sonucunda miR-200a/b'nin, lokal/lokal ileri prostat kanserinde bir onko-miR gibi, metastatik fazda ise, tümör baskılayıcı-epi-miR gibi davrandığını bulduk. Bulgularımız **Çizelge 3.5**'te gösterildi.

Epi-miRNA ekspresyon seviyelerinin kontrol grubu ve Gleason skorlarına (GS) göre karşılaştırılması sonucunda elde ettiğimiz bulgularımız; epi-miR-26a-1, miR-145-5p, miR-148b, miR-221 ve miR-506'nın ekspresyon seviyelerinin hasta gruplarımız arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$) (**Çizelge 3.6**). PCa'lı ve Met-PCa'lı her iki hasta grubumuzda da GS'deki artışla doğru orantılı olarak artan, epi-miR-29a, miR-29b, miR-101-1, miR-124, miR-140, miR-143, miR-200c, miR-217, miR-222, miR-301 ve miR-342'nin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.6**). PCa ve Met-PCa, her iki hasta grubunda da epi-miR-21, miR-26a-2, miR-26b, miR-29c, miR-34a-5p, miR-34b, miR-34c, miR-101-2, miR-126, miR-148a, miR-152 ve miR-185-5p'nin ekspresyon seviyelerinin, klinikopatolojik gruplarımızda bulunan GS'nin her bir değeri için istatistiksel ve klinik olarak anlamlı bir artış gösterdiğini bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.6**). Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bu sonuç ile bu epi-miRNA'ların prostat kanseri hastalığının prognozunda biyobelirteç olarak kullanılabileceğini bize düşündürmektedir.

Çalışmamızda epi-miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-148a, miR-152, miR-185-5p'nin ekspresyon seviyelerindeki artışın, promoter metilasyon yüzde seviyeleri ile de doğruluğu gösterilmiştir ($p<0.05$) (**Çizelge 3.6**). Bu epi-miRNA'ların promoter bölgeleri hipometile olarak bulundu ve PCa ilerlemesinde onco-miRNA'lar olarak görev yaptıkları gösterildi. Ek olarak, miR-200a/b'nin ekspresyon seviyesinde bulunan artış veya azalış GS'ye göre değerlendirildiği zaman, lokal/lokal ileri prostat kanserinde miR-200a/b'nin bir onko-miR gibi davrandığı, metastatik grupta ise bir tümör baskılayıcı-epi-miR gibi davrandığını bulduk. Bulgularımız **Çizelge 3.6**'da gösterildi.

TNM evrelemesine göre tüm gruplarımızda yapılan karşılaştırmalar sonucunda elde ettiğimiz bulgularımızda; epi-miR-26a-1, miR-145-5p ve miR-506'nın ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla hasta gruplarımız arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0.05$) (**Çizelge 3.7**). Her iki hasta grubumuzda da (PCa ve Met-PCa), epi-miR-21, miR-26a-2, miR-26b, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-34a-5p, miR-34b, miR-34c, miR-101-1, miR-101-2, miR-126, miR-140, miR-143, miR-148a, miR-148b, miR-152, miR-185-5p, miR-200c, miR-217, miR-221, miR-222, miR-301 ve miR-342'nin ekspresyon seviyelerinde

kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu bulduk ($p<0.05$) (**Çizelge 3.7**). Metastatik grupta (Met-PCa) bulunan T4N0/1M1 evresindeki artışların, epi-miRNA seviyelerinin kontrole göre kıyaslanmasında 12 ila 273 katı olduğunu bulduk.

Çalışmamız sonucunda bulduğumuz epi-miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-140, miR-148a, miR-152 ve miR-185-5p'nin promotor metilasyon yüzdelerindeki azalma, bize bu epi-miRNA'ların prostat kanseri prognozunda bir onko-miRNA biyobelirteci olabileceklerini göstermiştir. Ayrıca lokal/lokal ileri prostat kanseri grubumuzda epi-miR-124, miR-200a ve miR-200b'nin ekspresyon seviyelerinin arttığı, metastatik grupta ise keskin bir düşüş olduğu bulunmuştur ($p<0.05$) (**Çizelge 3.7**). Çalışılan epi-miRNA'ların promoter metilasyon yüzdelerinde bulduğumuz değişikliklerin, epi-miRNA ifadenme seviyesinde bulduğumuz bu değişikliklerle uyumlu olduğu gösterildi. Bulgularımız **Çizelge 3.7**'de gösterildi.

PCa'da prognostik onko-miR potansiyelli biyobelirteçler olduğunu gösterdiğimiz çalışmamızdan [60] seçtiğimiz miR-34b/c, miR-148a, miR-152 ve miR-200a/b epi-miRNA'larının ve bunların hedef genleri olan DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN gen ekspresyon seviyelerinin PCa, Met-PCa ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdiği bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak, araştırdığımız bu epi-miRNA'ların yine hedef genlerinden birisi olan NKX3.1'in ekspresyon seviyesi PCa, Met-PCa ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Kruskal Wallis-H Testi ile elde ettiğimiz bulgularımız **Çizelge 3.8**'de ve kutu grafiği olarak **Şekil 3.1**'de özetlenmiştir. NKX3.1 ekspresyon seviyesi gruplar arasında fark göstermediğinden çalışmamızın klinikopatolojik yönden değerlendirilmesine ve bu bağlamda tamamlayıcı karşılaştırma analizlerine dahil edilmemiştir.

Kontrol-PCa ve Kontrol-Met-PCa grupları ikili karşılaştırıldığında; DNMT1 geninin ifadenme düzeyinde PCa grubunda 5 kat, Met-PCa grubunda 6 kat istatistiksel olarak anlamlı artış bulunmuştur ($p<0.001$). Yine PCa ve Met-PCa gruplarımız kontrol ile karşılaştırıldığında; DNMT3a'nın PCa grubunda 5 kat, Met-PCa grubunda 2 kat ve DNMT3b'nin ifadenme düzeyinin ise PCa grubunda 3 kat, Met-PCa grubunda 2 kat istatistiksel olarak anlamlı azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Kontrole göre, DNMT3a ve DNMT3b genlerindeki azalmış ifade PCa ve Met-PCa

gruplarında anlamlı bulunurken; PTEN genindeki azalmış ifade ise sadece Met-PCa grubunda anlamlı olarak bulunmuştur ($p>0.05$) (**Çizelge 3.9**). Hastaların klinikopatolojik verilerine göre sınıflandırılarak değerlendirilmesi sonucunda elde ettiğimiz bulgular **Çizelge 3.10** (PSA), **Çizelge 3.11** (GS) ve **Çizelge 3.12** (TNM)'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre klinikopatolojik özellikler göz önüne alındığında her iki grupta da sadece DNMT1'de anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.01$).

Epi-miRNA ve onların hedef genleri arasında yaptığımız lineer regresyon analiz sonuçlarına göre, PCa grubunda, miR-34b DNMT1 ve DNMT3b ile; miR-34c ve miR-148a seçtiğimiz tüm hedef genler ile; miR-152 DNMT1, DNMT3b ve PTEN ile; miR-200a/b ise sadece DNMT1 ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermiştir ($p<0.05$) (**Çizelge 3.13**). Aynı hasta grubunda, araştırdığımız tüm miRNA'lar ile hedef genlerinden olan DNMT1 arasında anlamlı bir ilişki de görülmüştür ($p<0.05$) (**Çizelge 3.13**). Çalışmalarda DNMT1 ile tümör süpresör genler arasındaki ters orantılı etkileşim gösterilmiş olmasından dolayı, DNMT1'in tümör süpresör bir gen olan PTEN üzerindeki etkisini de çalışmamıza dahil etmek istedik. Çalışmamızda, PCa ve kontrol gruplarında PTEN ve DNMT1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$); Met-PCa grubunda PTEN ve DNMT1 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$) (**Çizelge 3.13**). Met-PCa grubunda, miR-148a, miR-152 ve miR-200b seçtiğimiz tüm hedef genler ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermiştir ($p<0.01$) (**Çizelge 3.13**). Aynı grupta, miR-34b, miR-34c ve miR-200a'nın araştırdığımız hedef genler ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$). Kontrol grubumuzda ise epi-miRNA'lar ve hedef genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p>0.05$) (**Çizelge 3.13**).

Çizelge 3.5. miRNA ifadenleme ve metilasyon seviyeleri ile PSA düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

		PCA				Met-PCA			
	Epi-miRNA		Kontrol	<10	≥ 10		Kontrol	≤ 20	> 20
1	miR-21	FC	1	7,05	5,54	FC	1	7,13	22,41
		P value		0,04	0,04	P value		0,002	0,001
		Mean ± SD		7±16,8	5,5±8,3	Mean ± SD		7,1±7,3	22,4±89,4
2	miR-26a-1	FC	1	0,94	3,76	FC	1	0,69	1
		P value		0,86	0,61	P value		0,54	1
		Mean ± SD		0,9±0,7	3,8±6,3	Mean ± SD		0,7±0,9	1±1,5
3	miR-26a-2	FC	1	2,43	7,76	FC	1	3,25	21,74
		P value		0,08	0,042	P value		0,04	0,001
		Mean ± SD		2,4±3	7,8±12,7	Mean ± SD		3,3±2,7	21,7±101,1
4	miR-26b	FC	1	4,07	10,26	FC	1	14,38	9,46
		P value		0,04	0,02	P value		0,002	0,002
		Mean ± SD		4±6	10,3±20,8	Mean ± SD		14,4±29,3	9,5±18,5
5	miR-29a	FC	1	1,07	4,8	FC	1	0,45	3,59
		P value		1,2	0,04	P value		0,5	0,04
		Mean ± SD		1±1,2	4,8±9,5	Mean ± SD		0,5±0,4	3,6±13,9
6	miR-29b	FC	1	1,95	1,72	FC	1	0,7	3,48
		P value		1,1	1,1	P value		0,98	0,04
		Mean ± SD		1,9±2,5	1,7±2,1	Mean ± SD		0,7±0,6	3,5±10,2
7	miR-29c	FC	1	6,55	106,01	FC	1	680,6	25,55
		P value		0,03	0,001	P value		0,001	0,001
		Mean ± SD		6,6±14,8	106±247,6	Mean ± SD		680,6±2006,3	25,6±100,4
8	miR-34a-5p	FC	1	4,6	8,78	FC	1	6,82	9,95
		P value		0,04	0,03	P value		0,02	0,02
		Mean ± SD		4,6±7,4	8,8±14,4	Mean ± SD		6,6±7,1	9,9±21,8
9	miR-34b	FC	1	4,46	6,9	FC	1	4,82	11
		P value		0,04	0,04	P value		0,04	0,01
		Mean ± SD		4,5±5	6,9±11,6	Mean ± SD		4,8±6	11±34,6
10	miR-34c	FC	1	6,91	23,61	FC	1	6,66	21,72
		p value		0,01	0,001	p value		0,01	0,001
		Mean ± SD		6,9±10,8	23,6±36,1	Mean ± SD		6,7±5,5	21,7±70,8

Çizelge 3.5. (devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile PSA düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

11	miR--101-1	FC	1	40,25	136,07	FC	1	1,57	4,4
		P value		0,001	0,001	P value		0,07	0,048
		Mean ± SD		40,3±70,8	136±294,8	Mean ± SD		1,6±3,4	4,4±11
12	miR-101-2	FC	1	1,75	4,79	FC	1	1,74	3,01
		P value		0,39	0,047	P value		0,38	0,045
		Mean ± SD		1,8±4,6	4,8±9,9	Mean ± SD		1,7±1,4	3±8,9
13	miR-124	FC	1	1,69	3,41	FC	1	0,37	0,3
		P value		0,12	0,074	P value		0,02	0,02
		Mean ± SD		1,7±2,4	3,4±5,7	Mean ± SD		0,4±0,6	0,3±0,6
14	miR-126	FC	1	2,28	2,64	FC	1	4,62	4,38
		P value		0,057	0,057	P value		0,04	0,04
		Mean ± SD		2,3±4,1	2,6±5	Mean ± SD		4,6±8,8	4,4±9,8
15	miR-140	FC	1	0,68	1,19	FC	1	1,55	1,57
		P value		0,9	1,3	P value		0,4	0,4
		Mean ± SD		0,7±0,8	1,2±1,9	Mean ± SD		1,6±2,9	1,6±3
16	miR-143	FC	1	6,55	16,63	FC	1	7,37	21,2
		P value		0,01	0,001	P value		0,01	0,001
		Mean ± SD		6,6±15,5	16,6±31,5	Mean ± SD		7,4±8,4	21,2±85,7
17	miR-145-5p	FC	1	1,1	2,57	FC	1	0,72	2,05
		P value		1,7	0,72	P value		1	0,6
		Mean ± SD		1,1±0,9	2,6±5,2	Mean ± SD		0,7±0,9	2±5
18	miR-148a	FC	1	10,76	107,19	FC	1	29,79	75,98
		P value		0,01	0,001	P value		0,001	0,001
		Mean ± SD		10,8±12,4	107±234,7	Mean ± SD		29,8±32,1	75±139,9
19	miR-148b	FC	1	2,79	19,88	FC	1	4,23	7,31
		P value		0,046	0,001	P value		0,04	0,02
		Mean ± SD		2,8±2,1	19,9±41,9	Mean ± SD		4,2±5,6	7,3±17,4
20	miR-152	FC	1	9,97	4,59	FC	1	15,4	59,44
		p value		0,01	0,01	p value		0,001	0,001
		Mean ± SD		10±16,3	4,6±7,1	Mean ± SD		15,4±29,4	59,4±84,1

Çizelge 3.5. (devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile PSA düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

21	miR-185-5p	FC	1	20,7	33,34	FC	1	8,25	60,23
		P value		0,001	0,001	P value		0,04	0,001
		Mean ± SD		20,7±30,5	33,3±72,9	Mean ± SD		8,3±15,8	60,2±179,3
22	miR-200a	FC	1	1,61	3,55	FC	1	0,47	2,01
		P value		0,24	0,041	P value		0,049	0,04
		Mean ± SD		1,6±1,8	3,6±5,5	Mean ± SD		0,5±0,3	2,9±9,6
23	miR-200b	FC	1	5,6	19,61	FC	1	2,7	3,37
		P value		0,03	0,001	P value		0,07	0,04
		Mean ± SD		5,6±6,2	19,6±34,6	Mean ± SD		2,7±3	3,4±4,3
24	miR-200c	FC	1	3,13	6,09	FC	1	3,57	8,92
		P value		0,052	0,03	P value		0,04	0,01
		Mean ± SD		3,1±2,8	6±9,4	Mean ± SD		3,6±3,4	8,9±17,6
25	miR-221	FC	1	5,26	4,93	FC	1	14,87	16,57
		P value		0,03	0,04	P value		0,003	0,003
		Mean ± SD		5,3±6,8	4,9±5,4	Mean ± SD		14,9±23,5	16,6±32,4
26	miR-222	FC	1	115,95	34,02	FC	1	338,3	25,83
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001
		Mean ± SD		116±441,7	34±67	Mean ± SD		338,3±845,6	25,8±47,2
27	miR-217	FC	1	2,61	4,09	FC	1	4,26	5,68
		P value		0,059	0,04	P value		0,04	0,04
		Mean ± SD		2,6±4,7	4±6,3	Mean ± SD		4,3±4,1	5,7±9,5
28	miR-301	FC	1	2,45	3,88	FC	1	2,86	4,72
		P value		0,05	0,04	P value		0,07	0,04
		Mean ± SD		2,5±3,5	3,9±6,5	Mean ± SD		2,9±2,5	4,7±9
29	miR-342	FC	1	3,15	3,43	FC	1	10,85	4,18
		P value		0,061	0,06	P value		0,002	0,03
		Mean ± SD		3,4±4,7	3,1±5,1	Mean ± SD		10,9±12	4,2±6,5
30	miR-506	FC	1	1,13	2,43	FC	1	0,51	0,97
		P value		1	0,07	P value		0,05	1
		Mean ± SD		1,1±1,7	2,4±3,8	Mean ± SD		0,5±0,7	1±1,8

Çizelge 3.5.(devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile PSA düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

Metilasyon									
1	miR-34a-5p	FC	28,63	10,01	24,02	FC	28,63	19,11	16,76
		P value		0,03	0,12	P value		0,71	0,56
		Mean ± SD	28,6±27,3	10±12,9	24±33,4	Mean ± SD	28,6±27,3	19,1±26,5	16,8±15,5
2	miR-34b/c	FC	10,33	3,72	17,71	FC	10,33	3,66	4,83
		P value		0,01	0,05	P value		0,002	0,002
		Mean ± SD	10,3±10,3	3,7±8	17,7±34,6	Mean ± SD	10,3±10,3	3,7±4	4,8±6,3
3	miR-101-2	FC	9,01	7,53	11,05	FC	9,01	7,09	6,37
		P value		0,24	0,27	P value		0,31	0,29
		Mean ± SD	9±7,3	7,5±16,6	11±16	Mean ± SD	9±7,3	7±4,4	6,4±7,2
4	miR-126	FC	8,74	6,3	6,6	FC	8,74	5,96	5,78
		P value		0,9	0,9	P value		0,4	0,34
		Mean ± SD	8,7±6,4	6,3±6,5	6,6±3,9	Mean ± SD	8,7±6,4	6±3,2	5,8±5,3
5	miR-140	FC	6,97	3,7	6,42	FC	6,97	3,6	16,47
		P value		0,02	1,7	P value		0,02	0,02
		Mean ± SD	7±10	3,7±5,1	6,4±9,5	Mean ± SD	7±10	3,6±4,4	16,4±25
6	miR-148a	FC	20,87	8,13	17,39	FC	20,87	8,63	8,12
		P value		0,02	0,054	P value		0,01	0,01
		Mean ± SD	20,9±18,5	8,1±12,7	17,4±15,7	Mean ± SD	21±18,5	8,6±7,4	8,1±6,9
7	miR-152	FC	19,77	14,29	8,5	FC	19,77	15,61	11,27
		P value		0,071	0,004	P value		0,08	0,06
		Mean ± SD	19,8±9,7	14,3±8,4	8,5±2,6	Mean ± SD	19,8±9,7	15,6±9,4	11,3±5,3
8	miR-185-5p	FC	10,74	6,82	8,17	FC	10,74	8,47	8,37
		P value		0,05	0,07	P value		0,06	0,06
		Mean ± SD	10,7±8,3	6,8±7,2	8,2±4,4	Mean ± SD	10,7±8,3	8,4±7	8,5±7,3
9	miR-200a/b	FC	8,63	1,49	5,03	FC	8,63	11,48	13,03
		P value		0,01	0,04	P value		0,04	0,02
		Mean ± SD	8,6±7,7	1,5±1,4	5±5,6	Mean ± SD	8,6±7,7	11,5±15,1	13±24

Çizelge 3.6. miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile gleason skrolama düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

		PCA						Met-PCA				
	Epi-miRNA		Kontrol	6	7	8	10		Kontrol	8	9	10
1	miR-21	FC	1	2,16	12,24	0,84	3,52	FC	1	6,21	37,7	5,41
		P value		0,061	0,001	0,23	0,032	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		2,2±2,9	12,2±21	0,8±0,7	3,5±0	Mean ± SD		6,2±7	37,7±122	5,4±6,6
2	miR-26a-1	FC	1	0,89	2,35	1,86	0,06	FC	1	0,53	1,44	0,61
		P value		0,06	0,051	0,86	0,06	P value		0,24	0,09	0,18
		Mean ± SD		0,9±0,7	2,3±4,6	1,9±2	0	Mean ± SD		0,5±0,5	1,4±1,8	0,6±0,8
3	miR-26a-2	FC	1	0,88	5,82	3,7	8,76	FC	1	3,95	38,6	1,68
		P value		0,09	0,01	0,03	0,01	P value		0,04	0,001	0,18
		Mean ± SD		0,9±0,8	5,8±9,4	3,7±5,4	8,8±0	Mean ± SD		4±2,6	38,6±138,2	1,7±1,6
4	miR-26b	FC	1	3,3	8,6	3,51	0,79	FC	1	13,44	14,9	2,24
		P value		0,03	0,01	0,027	0,087	P value		0,001	0,001	0,045
		Mean ± SD		3,3±5,1	8,6±15,9	3,5±3,7	0,8±0	Mean ± SD		13,4±26,7	14,9±24	2,2±2,1
5	miR-29a	FC	1	0,69	3,31	1,31	1,93	FC	1	1,37	5,75	0,4
		P value		0,14	0,04	0,34	0,21	P value		0,51	0,042	0,046
		Mean ± SD		0,7±0,3	3,3±7	1,3±1,7	1,9±0	Mean ± SD		1,4±1,5	5,7±19	0,4±0,5
6	miR-29b	FC	1	1,19	2,62	0,62	4,69	FC	1	1,3	5,44	0,78
		P value		0,35	0,24	0,22	0,04	P value		0,74	0,038	0,069
		Mean ± SD		1,2±0,6	2,6±3,2	0,6±0,4	4,7±0	Mean ± SD		1,3±1,3	5,4±13,9	0,8±0,6
7	miR-29c	FC	1	2,14	63,11	2,98	35,85	FC	1	7,87	13,29	549,4
		P value		0,2	0,001	0,2	0,001	P value		0,04	0,02	0,001
		Mean ± SD		2,1±2,1	63,1±182,6	3±28	35,8±0	Mean ± SD		7,9±19,7	13,3±26,5	549,4±1733,3
8	miR-34a-5p	FC	1	2,75	8,75	3,7	5,2	FC	1	4,54	15	5,83
		P value		0,15	0,03	0,09	0,04	P value		0,12	0,01	0,08
		Mean ± SD		2,7±1,5	8,7±13,7	3,7±2,6	5,2±0	Mean ± SD		4,5±4,3	15±28,4	5,8±9,7
9	miR-34b	FC	1	5,06	5,19	5,35	2,56	FC	1	4,23	17,61	3,75
		P value		0,03	0,03	0,03	0,13	P value		0,04	0,01	0,04
		Mean ± SD		5±6,5	5,2±8,5	5,3±4,8	2,6±0	Mean ± SD		4,2±3,6	17,6±47	3,7±4,5
10	miR-34c	FC	1	4,91	18,19	5,5	7,37	FC	1	8,59	32,9	7,56
		p value		0,02	0,001	0,01	0,01	p value		0,004	0,001	0,02
		Mean ± SD		4,9±5,6	18,2±29,1	5,5±6	7,4±0	Mean ± SD		8,6±6,2	32,9±96	7,6±15,8
11	miR--101-1	FC	1	41,66	92,74	33,12	1,74	FC	1	3,28	3,5	4,5
		P value		0,001	0,001	0,001	0,44	P value		0,04	0,04	0,04
		Mean ± SD		41,7±79,6	927±208,8	33,1±51,6	1,7±0	Mean ± SD		3,3±7,5	3,5±8	4,5±13,8
12	miR-101-2	FC	1	0,82	4,68	0,63	0,51	FC	1	1	5,58	1,14
		P value		0,063	0,02	0,11	0,052	P value		1	0,01	0,26
		Mean ± SD		0,8±0,5	4,7±9	0,6±0,3	0,5±0	Mean ± SD		1±1,2	5±11,9	1,1±1,2
13	miR-124	FC	1	1,15	3,14	1,28	2,63	FC	1	0,34	0,38	0,2
		P value		0,75	0,04	0,69	0,04	P value		0,042	0,041	0,54
		Mean ± SD		1,1±0,6	3,1±5	1,3±0,9	2,6±0	Mean ± SD		0,3±0,6	0,4±0,7	0,2±0,4

Çizelge 3.6.(devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile gleason skorumla düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

14	miR-126	FC	1	1,32	2,73	4,89	1,23	FC	1	2,66	7,46	2,02
		P value		0,09	0,06	0,03	0,13	P value		0,051	0,034	0,074
		Mean ± SD		1,3±2,5	2,7±4,6	4,9±8	1,2±0	Mean ± SD		2,7±3,8	7,5±14	2±2,6
15	miR-140	FC	1	0,55	1,01	0,83	0,81	FC	1	0,65	2,91	0,61
		P value		0,1	0,1	0,1	0,1	P value		0,14	0,043	0,11
		Mean ± SD		0,6±0,4	1±1,6	1±0,8	0,8±0	Mean ± SD		0,6±0,9	2,9±4,2	0,6±0,7
16	miR-143	FC	1	2,91	16,67	1,35	7,81	FC	1	3,44	35,72	7,76
		P value		0,062	0,001	0,64	0,041	P value		0,098	0,01	0,034
		Mean ± SD		2,9±2,4	16,7±29,2	1,4±0,9	7,8±0	Mean ± SD		3,4±2,9	35,7±116,9	7,8±10,2
17	miR-145-5p	FC	1	0,75	1,92	1,51	1,58	FC	1	0,88	2,94	0,93
		P value		0,32	0,14	0,52	0,51	P value		0,4	0,1	0,5
		Mean ± SD		0,7±0,5	1,9±3,7	1,5±1,7	1,6±0	Mean ± SD		0,9±0,6	2,9±6,8	0,9±1,4
18	miR-148a	FC	1	11,02	62,51	7,93	26	FC	1	72,38	86,98	27,46
		P value		0,01	0,001	0,04	0,02	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		11±11,9	62,5±174	7,9±5,6	26±0	Mean ± SD		72,4±127,5	87±156,8	27,5±55
19	miR-148b	FC	1	4,1	10,65	3,55	3,42	FC	1	4,92	10,39	3,09
		P value		0,06	0,02	0,06	0,06	P value		0,06	0,1	0,06
		Mean ± SD		4,1±2,6	10,6±31,4	3,6±2,4	3,4±0	Mean ± SD		4,9±6,8	10,4±22,9	3±5,5
20	miR-152	FC	1	10	9,21	0,76	18,06	FC	1	52,5	62,44	23,34
		p value		0,002	0,002	0,1	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		10±12,8	9,2±19,1	0,8±1,1	18±0	Mean ± SD		52,5±43,5	62,4±106,5	23,4±42,6
21	miR-185-5p	FC	1	23,54	29,3	4,66	21,72	FC	1	12,45	92,07	16,28
		P value		0,001	0,001	0,038	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		23,5±40,7	29,3±52,6	4,7±3,9	21,7±0	Mean ± SD		12,4±19,7	92±236,2	16,2±36,9
22	miR-200a	FC	1	1,91	2,28	2,32	0,8	FC	1	0,96	4,33	0,9
		P value		0,07	0,06	0,058	0,31	P value		0,87	0,04	0,97
		Mean ± SD		1,9±2,2	2,3±4,2	2,3±2	0,8±0	Mean ± SD		0,9±0,8	4,3±13,2	0,9±0,8
23	miR-200b	FC	1	4,37	13,21	3,3	25,13	FC	1	3,81	4,15	1,43
		P value		0,02	0,001	0,038	0,001	P value		0,037	0,024	0,061
		Mean ± SD		4,4±5,4	13,2±25,6	3,3±3,3	25,1±0	Mean ± SD		3,8±3,1	4,1±5,3	1,4±1,8
24	miR-200c	FC	1	2,51	5,15	2,29	7,4	FC	1	4,66	13,58	2,59
		P value		0,068	0,035	0,069	0,021	P value		0,025	0,01	0,054
		Mean ± SD		2,5±2	5,1±7,2	2,3±1,9	7,4±0	Mean ± SD		4,7±3,6	13,6±23,2	2,6±3,5
25	miR-221	FC	1	3,06	8	2,09	4,65	FC	1	25,12	15,7	8,61
		P value		0,04	0,01	0,03	0,03	P value		0,001	0,001	0,01
		Mean ± SD		3±3,2	8±8,5	2±1,5	4,6±0	Mean ± SD		25,1±43	15,7±29	8,6±13,7
26	miR-222	FC	1	199,68	4,45	56,2	192,89	FC	1	30,04	201,18	22,51
		P value		0,001	0,16	0,01	0,001	P value		0,02	0,001	0,02
		Mean ± SD		199,7±608,4	4,4±10,5	56,2±96,6	192,9±0	Mean ± SD		30±38,2	201,1±638,5	22,5±61,5
27	miR-217	FC	1	1,46	4,74	1,44	2,93	FC	1	4,07	7,87	3,16
		P value		0,09	0,03	0,09	0,05	P value		0,03	0,02	0,04
		Mean ± SD		1,5±0,9	4,7±7,3	1,4±0,8	2,9±0	Mean ± SD		4±3,4	7,9±12,3	3,1±4,3

Çizelge 3.6.(devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile gleason skorumla düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

28	miR-301	FC	1	0,94	4,24	3,38	2,12	FC	1	2,9	6,52	2,59
		P value		0,87	0,048	0,049	0,051	P value		0,068	0,02	0,07
		Mean ± SD		0,9±0,6	4,2±5,7	3,8±4,8	2,1±0	Mean ± SD		2,9±2,6	6,5±11,4	2,6±5,3
29	miR-342	FC	1	3,93	3,58	1,6	1,46	FC	1	4,87	7,06	4,37
		P value		0,24	0,24	0,64	0,64	P value		0,04	0,02	0,04
		Mean ± SD		3,9±3,6	3,6±6,3	1,6±2,5	1,5±0	Mean ± SD		4,9±7,8	7±9,7	4,4±6,8
30	miR-506	FC	1	0,61	2,39	0,91	1,04	FC	1	0,57	1,29	0,57
		P value		0,4	0,1	0,5	0,1	p value		0,3	0,21	0,2
		Mean ± SD		0,6±0,7	2,4±3,4	0,9±0,9	1±0	Mean ± SD		0,6±0,5	1,3±2,4	0,6±0,7
Metilasyon												
1	miR-34a-5p	FC	28,63	11,85	10,75	32,07	1,29	FC	28,6	12,02	19,83	18,76
		P value		0,038	0,034	0,059	0,001	P value		0,03	0,04	0,04
		Mean ± SD	28,6±27,3	11,8±14,6	10,7±10,7	32±50,7	1,3±0	Mean ± SD		12±9,8	19,8±21,7	18,8±19,2
2	miR-34b/c	FC	10,33	0,86	5,97	39,98	0	FC	10,3	1,59	4,37	7,69
		P value		0,001	0,02	0,01	-	P value		0,001	0,04	0,089
		Mean ± SD	10,3±10,3	0,9±1	6±9,7	40±55,9	0	Mean ± SD		1,6±1,2	4,4±3,8	7,7±8,7
3	miR-101-2	FC	9,01	4,94	10,3	14,53	3,04	FC	9,01	7,37	5,38	7,1
		P value		0,03	0,13	0,041	0,024	P value		0,052	0,041	0,048
		Mean ± SD	9±7,3	4,9±5,7	10,3±21,1	14,5±24,6	3±0	Mean ± SD		7,4±6,4	5,4±5,2	7,1±8,4
4	miR-126	FC	8,74	6,4	7,84	1,9	3,41	FC	8,74	6,5	5,2	6,03
		P value		0,13	0,11	0,03	0,04	P value		0,13	0,095	0,12
		Mean ± SD	8,7±6,4	6,4±6,1	7,8±6,4	1,9±1	3,4±0	Mean ± SD		6,5±5	5,2±4,5	6±5,4
5	miR-140	FC	6,97	5,84	3,13	4,11	0	FC	6,97	9,14	21,99	6,92
		P value		0,62	0,08	0,12	-	P value		0,12	0,001	0,62
		Mean ± SD	7±10	5,8±6	3,1±6,9	4,1±5,9	0	Mean ± SD		9,1±18,6	22±29,7	6,9±11,9
6	miR-148a	FC	20,87	8,65	11,99	13,26	0,69	FC	20,8	5,52	9,55	8,98
		P value		0,035	0,048	0,027	0,001	P value		0,01	0,01	0,01
		Mean ± SD	20,9±18,5	8,6±11,5	12±15,3	13,3±20	0,7±0	Mean ± SD		5,5±3,9	9,6±7,2	9±8,2
7	miR-152	FC	19,77	14,17	12,72	11,41	6,61	FC	19,7	10,4	13,14	12,85
		P value		0,3	0,3	0,3	0,01	P value		0,04	0,1	0,1
		Mean ± SD	19,8±9,7	14,2±9,5	12,7±7,4	11,4±4,4	6,6±0	Mean ± SD		10,4±4,2	13,1±8,2	12,8±6
8	miR-185-5p	FC	10,74	8,99	5,8	6,62	3,94	FC	10,7	9,31	9,6	6,11
		P value		0,59	0,044	0,042	0,03	P value		0,54	0,54	0,55
		Mean ± SD	10,7±8,3	9±9,2	5,8±4,3	6,6±1,6	3,9±0	Mean ± SD		9,3±7,2	9,6±8,6	6,1±4,6
9	miR-200a/b	FC	8,63	2,88	2,15	1,71	1,05	FC	8,63	24,36	12,42	5,34
		P value		0,001	0,001	0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,03
		Mean ± SD	8,6±7,7	2,9±4,9	2,1±1,5	1,7±1,7	1±0	Mean ± SD		24,3±40,2	12,4±17,1	5,3±4,1

Çizelge 3.7. miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile T evreleme düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

		PCA				Met-PCA				
	Epi-miRNA		Kontrol	T2	T3		Kontrol	T3	T3/4	T4
1	miR-21	FC	1	3,19	11,55	FC	1	6,47	6,44	103,44
		P value		0,013	0,001	P value		0,002	0,002	0,0001
		Mean ± SD		3,2±5,4	11,6±22	Mean ± SD		6,5±8,3	6,4±5,9	103,4±218,7
2	miR-26a-1	FC	1	2,11	0,88	FC	1	0,65	0,82	2
		P value		0,018	0,06	P value		0,047	0,065	0,042
		Mean ± SD		2,1±4	0,9±0,8	Mean ± SD		0,7±0,96	0,8±0,9	2±3,1
3	miR-26a-2	FC	1	3,87	3,46	FC	1	4,51	3,09	112,39
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,0001
		Mean ± SD		3,9±8,4	3,5±3,6	Mean ± SD		4,6±4,2	3,1±3,2	112,4±248,3
4	miR-26b	FC	1	6,4	4,29	FC	1	6,59	8,73	27,54
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,001
		Mean ± SD		6,4±13,6	4,3±6,8	Mean ± SD		6,6±15,1	8,7±18,2	27,5±37,4
5	miR-29a	FC	1	2,36	1,38	FC	1	1,17	0,91	15,65
		P value		0,03	0,03	P value		0,055	0,054	0,001
		Mean ± SD		2,4±6	1,4±1,6	Mean ± SD		1,2±1,5	0,9±1,2	15,7±34,3
6	miR-29b	FC	1	1,31	2,77	FC	1	1,73	1,38	12,08
		P value		0,03	0,01	P value		0,03	0,02	0,01
		Mean ± SD		1,3±1,4	2,8±3,2	Mean ± SD		1,7±3,7	1,4±1,2	12,1±24,7
7	miR-29c	FC	1	43,04	11,48	FC	1	8,54	271,81	2,81
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,001	0,02
		Mean ± SD		43±157,2	11,4±19,6	Mean ± SD		8,5±25,6	271,8±1204,6	2,8±2,1
8	miR-34a-5p	FC	1	5,03	6,47	FC	1	6,98	6,14	28,55
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,01
		Mean ± SD		5±9,1	6,5±10,1	Mean ± SD		7±8,2	6,1±7,5	28,6±50,6
9	miR-34b	FC	1	6,17	3,36	FC	1	4,68	4,64	43,02
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,001
		Mean ± SD		6,2±8,6	3,4±2,9	Mean ± SD		4,7±5,8	4,6±7,1	43±82,7
10	miR-34c	FC	1	10,97	10,85	FC	1	8,26	8,91	82,84
		p value		0,001	0,001	p value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		11±23,8	10,9±14,6	Mean ± SD		8,4±7,1	8,9±12,6	82,8±172,7
11	miR--101-1	FC	1	65,51	52,79	FC	1	0,57	3,63	10,64
		P value		0,0001	0,0001	P value		0,05	0,02	0,001
		Mean ± SD		65,6±181,4	52,8±71	Mean ± SD		0,6±0,8	3,6±8,1	10,6±21,2
12	miR-101-2	FC	1	2,28	2,79	FC	1	1,35	1,65	10,6
		P value		0,028	0,031	P value		0,071	0,059	0,012
		Mean ± SD		2,3±6,3	2,8±6,3	Mean ± SD		1,4±1,4	1,7±1,8	10,6±21,6
13	miR-124	FC	1	1,91	2,38	FC	1	0,49	0,22	0,41
		P value		0,021	0,017	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		1,9±3,6	2,4±3,2	Mean ± SD		0,5±0,8	0,2±0,5	0,4±0,7
14	miR-126	FC	1	1,78	3,24	FC	1	5,38	2,4	12,32
		P value		0,03	0,01	P value		0,01	0,01	0,002
		Mean ± SD		1,8±3,7	3,2±5	Mean ± SD		5,4±8,9	2,4±2,6	12,3±23,1

Çizelge 3.7. (devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile T evreleme düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

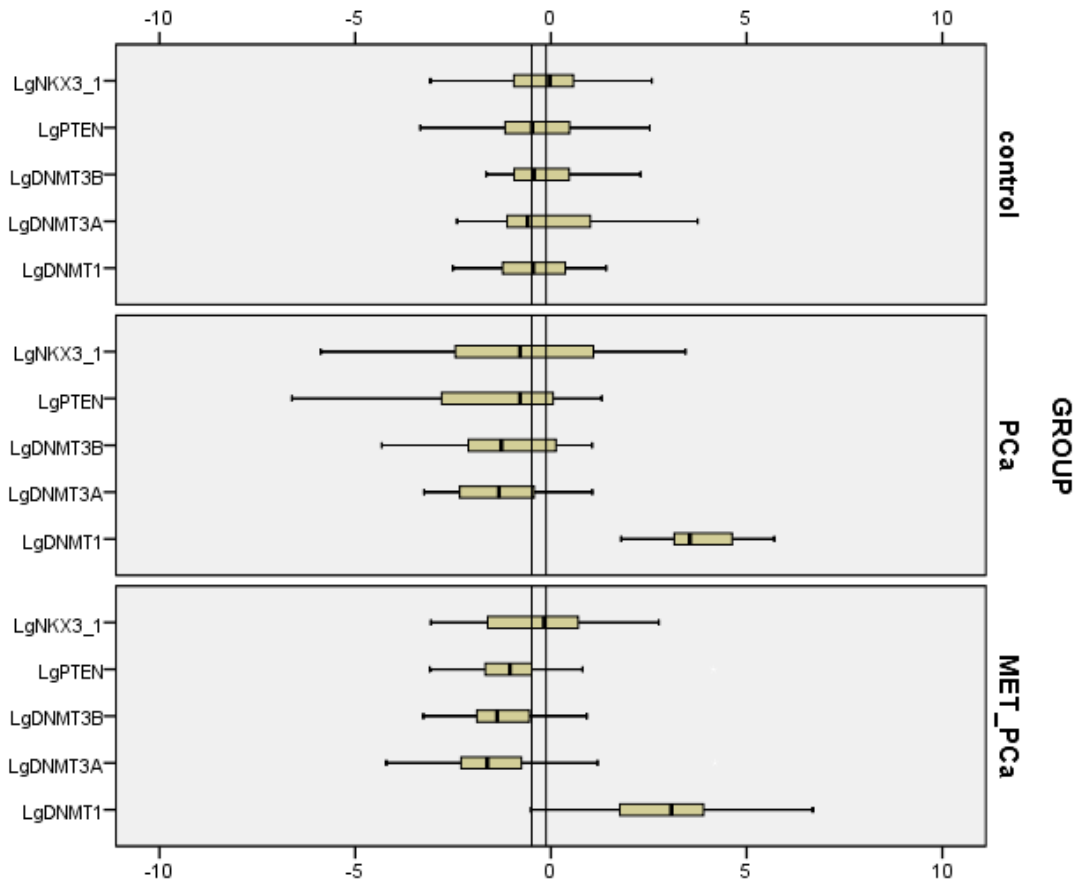
15	miR-140	FC	1	0,63	1,05	FC	1	2,47	0,87	3,07
		P value		0,06	0,12	P value		0,04	0,052	0,01
		Mean ± SD		0,6±1,2	1±1	Mean ± SD		2,5±4,2	0,9±1	3,1±5,3
16	miR-143	FC	1	7,41	11,31	FC	1	6,33	4,45	106,48
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,0001
		Mean ± SD		7,4±20,3	11,3±20,8	Mean ± SD		6,3±8,3	4,5±4	106,5±205,6
17	miR-145-5p	FC	1	1,73	1,03	FC	1	1,48	0,97	5,98
		P value		0,03	0,12	P value		0,01	0,062	0,01
		Mean ± SD		1,7±3,2	1±0,9	Mean ± SD		1,5±2,5	1±1,1	6±12
18	miR-148a	FC	1	46,45	15,09	FC	1	68,14	47,58	138,83
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		46,4±149,2	15,1	18,2		68,1±103,6	47,6±89,7	138,8±261,6
19	miR-148b	FC	1	9,32	3,26	FC	1	5,82	3,7	22,12
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,001
		Mean ± SD		9,3±26,6	3,7±5,3	Mean ± SD		5,8±6,4	3,7±5,3	22,1±40,9
20	miR-152	FC	1	5,89	13	FC	1	25,6	52,92	80,15
		p value		0,001	0,001	p value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		5,9±8,8	13±20,5	Mean ± SD		25,6±38,8	52,9±74,3	80,2±132
21	miR-185-5p	FC	1	32,22	11	FC	1	22,94	57,49	41,6
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		32,2±53,7	11±10,5	Mean ± SD		22,9±45,2	57,5±193,4	41,6±80,2
22	miR-200a	FC	1	1,82	2,46	FC	1	0,9	0,98	11,62
		P value		0,048	0,042	P value		0,12	0,23	0,021
		Mean ± SD		1,8±3,5	2,5±2,4	Mean ± SD		0,9±1,3	1±0,9	11,6±23,5
23	miR-200b	FC	1	9,24	8,55	FC	1	4,18	2,31	5,64
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,01
		Mean ± SD		9,2±22,2	8,6±8,8	Mean ± SD		4,2±4,5	2,3±2,7	5,6±7,3
24	miR-200c	FC	1	3,29	4,67	FC	1	4,73	6	21,64
		P value		0,02	0,02	P value		0,01	0,01	0,001
		Mean ± SD		3,3±6,1	4,7±3,4	Mean ± SD		4,7±4,8	6±6,3	21,6±42,1
25	miR-221	FC	1	3,54	7,64	FC	1	23,32	10,62	28,58
		P value		0,01	0,01	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean ± SD		3,5±4,7	7,6±8	Mean ± SD		23,3±42,7	10,6±16,4	28,6±50,4
26	miR-222	FC	1	147,07	20,12	FC	1	273,2	44,62	3,35
		P value		0,0001	0,001	P value		0,0001	0,001	0,01
		Mean ± SD		147,1±495,4	20,1±60,7	Mean ± SD		273,2±804,9	44,6±95,6	3,4±5,7
27	miR-217	FC	1	2,71	4,09	FC	1	4,3	4,38	12,09
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,01
		Mean ± SD		2,2±4,1	4,1±6,4	Mean ± SD		4,3±5	4,4±3,9	12±21,9
28	miR-301	FC	1	2,6	3,1	FC	1	3,18	3,38	10,87
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,002
		Mean ± SD		2,6±4,8	3,1±3,7	Mean ± SD		3,2±3,8	3,4±4,2	10,9±20,6
29	miR-342	FC	1	1,92	5,62	FC	1	9,91	4,19	2,87
		P value		0,01	0,01	P value		0,01	0,01	0,01
		Mean ± SD		1,9±2,2	5,6±6,6	Mean ± SD		9,9±12,9	4,2±5,6	2,9±3,2

Çizelge 3.7. (devam) miRNA ifadelenme ve metilasyon seviyeleri ile T evreleme düzeyinin kontrol, PCa ve Met-PCa hasta kanlarındaki ilişkileri. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir ($p<0.05$).

30	miR-506	FC	1	1,44	1,45	FC	1	0,69	0,58	2,59
		P value		0,06	0,06	P value		0,07	0,05	0,04
		Mean $\pm$ SD		1,4 $\pm$ 2,5	1,5 $\pm$ 2,3	Mean $\pm$ SD		0,7 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 4
Metilasyon										
1	miR-34a-5p	FC	28,63	19,04	9,59	FC	28,63	11,28	18,93	21,53
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean $\pm$ SD	28,6 $\pm$ 27,3	9,6 $\pm$ 12,6	19 $\pm$ 27,4	Mean $\pm$ SD		11,3 $\pm$ 10,6	18,9 $\pm$ 20,4	21,5 $\pm$ 18,9
2	miR-34b/c	FC	10,33	0,47	16,93	FC	10,33	3,26	4,1	8,95
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,002
		Mean $\pm$ SD	10,3 $\pm$ 10,3	0,5 $\pm$ 0,4	16,9 $\pm$ 27	Mean $\pm$ SD		3,3 $\pm$ 2,3	4,1 $\pm$ 5,6	9 $\pm$ 9,6
3	miR-101-2	FC	9,01	3,46	15,74	FC	9,01	7,72	5,44	9,83
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,13
		Mean $\pm$ SD	9 $\pm$ 7,3	3,5 $\pm$ 4,5	15,7 $\pm$ 23,8	Mean $\pm$ SD		7,7 $\pm$ 5,4	5,4 $\pm$ 6,3	9,8 $\pm$ 10
4	miR-126	FC	8,74	5,82	7,21	FC	8,74	7,29	4,88	7,4
		P value		0,001	0,001	P value		0,01	0,001	0,01
		Mean $\pm$ SD	8,7 $\pm$ 6,4	5,8 $\pm$ 5,6	7,2 $\pm$ 6,6	Mean $\pm$ SD		7,3 $\pm$ 4,9	4,9 $\pm$ 4,8	7,4 $\pm$ 5
5	miR-140	FC	6,97	3,95	5,1	FC	6,97	9,55	15,88	11,06
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean $\pm$ SD	7 $\pm$ 10	4 $\pm$ 5,6	5,1 $\pm$ 7,8	Mean $\pm$ SD		9,6 $\pm$ 11,8	15,9 $\pm$ 27,3	11 $\pm$ 17
6	miR-148a	FC	20,87	6,25	16,51	FC	20,87	6,84	8,95	7,58
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean $\pm$ SD	20,9 $\pm$ 18,5	6,2 $\pm$ 9,2	16,5 $\pm$ 17,5	Mean $\pm$ SD		6,8 $\pm$ 5,4	8,9 $\pm$ 7,9	7,6 $\pm$ 4,9
7	miR-152	FC	19,77	14,11	11,08	FC	19,77	9,72	13,34	12,27
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean $\pm$ SD	19,8 $\pm$ 9,7	14,1 $\pm$ 9,5	11 $\pm$ 4	Mean $\pm$ SD		9,7 $\pm$ 3,3	13,3 $\pm$ 7,2	12,2 $\pm$ 7,6
8	miR-185-5p	FC	10,74	7,36	8,82	FC	10,74	9,66	7,25	11,77
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,001
		Mean $\pm$ SD	10,7 $\pm$ 8,3	7,3 $\pm$ 7,7	6,8 $\pm$ 4,6	Mean $\pm$ SD		9,7 $\pm$ 8,2	7,2 $\pm$ 5,4	11,8 $\pm$ 11,4
9	miR-200a/b	FC	8,63	1,51	3,59	FC	8,63	17,07	12,57	6,44
		P value		0,001	0,001	P value		0,001	0,001	0,003
		Mean $\pm$ SD	8,6 $\pm$ 7,7	1,5 $\pm$ 1,5	3,6 $\pm$ 4,6	Mean $\pm$ SD		17 $\pm$ 27,3	12,6 $\pm$ 23,7	6,4 $\pm$ 4,5

Çizelge 3.8. DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN, NKX3.1 gen ifadenme düzeylerinin kontrol, PCa ve Met-PCa grupları arasındaki üçlü karşılaştırılması (Kruskal-Wallis-H testi sonuçları). İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Kruskal Wallis H Test (Kontrol, PCa ve Met-PCa)					
	LgDNMT1	LgDNMT3a	LgDNMT3b	LgPTEN	LgNKX3_1
Chi-Square	34,544	8,447	11,447	6,018	1,64
Asymp. Sig.	0,0000	0,0150	0,0030	0,0490	0,4400



Şekil 3.1. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarının DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN, NKX3.1 gen ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması sonucunda elde edilen kutu grafiği (box-plot).

Çizelge 3.9. Kruskal-Wallis-H testi ile anlamlı bulunan DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, PTEN genlerinin ifadelenme seviyelerinin gruplar arası farklılığını gösteren Post Hoc Test sonuçları

Post Hoc Test					
Tamhane					
Dependent Variable	GROUP	GROUP	Mean Difference	Std. Error	Sig.
LgDNMT1	control	PCa	-3,63700000*	0,4812	0,000
		MET PCa	-3,05304957*	0,4801	0,000
	PCa	control	3,63700000*	0,4812	0,000
		MET PCa	0,58395043	0,4015	0,388
	MET_PCa	control	3,05304957*	0,4801	0,000
		PCa	-0,58395043	0,4015	0,388
LgDNMT3A	control	PCa	1,57846667*	0,5255	0,013
		MET PCa	1,16456752	0,5022	0,071
	PCa	control	-1,57846667*	0,5255	0,013
		MET PCa	-0,41389915	0,4952	0,791
	MET_PCa	control	-1,16456752	0,5022	0,071
		PCa	0,41389915	0,4952	0,791
LgDNMT3B	control	PCa	1,29013333*	0,4285	0,013
		MET PCa	1,05135897*	0,3609	0,015
	PCa	control	-1,29013333*	0,4285	0,013
		MET PCa	-0,23877436	0,4159	0,920
	MET_PCa	control	-1,05135897*	0,3609	0,015
		PCa	0,23877436	0,4159	0,920
LgPTEN	control	PCa	1,05939316	0,4524	0,069
		MET PCa	1,49426667*	0,5732	0,036
	PCa	control	-1,05939316	0,4524	0,069
		MET PCa	-0,4348735	0,5137	0,786
	MET_PCa	control	-1,49426667*	0,5732	0,036
		PCa	0,4348735	0,5137	0,786

Çizelge 3.10. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarındaki DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ekspresyon düzeylerinin PSA seviyelerine göre karşılaştırmalı analizi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

	PCA				Met-PCA			
PSA		Kontrol	<10	≥ 10		Kontrol	≤ 20	> 20
DNMT1	FC	1	19,56	6,08	FC	1	22,95	6,69
	P value		0,005	0,014	P value		0,001	0,000
	Mean ± SD		19±0,693	6±0,492	Mean ± SD		23±0,504	7±0,500
DNMT3A	FC	1	0,59	0,26	FC	1	1,90	0,83
	P value		0,371	0,146	P value		0,154	0,817
	Mean ± SD		0,6±1,099	0,3±1,429	Mean ± SD		2±0,746	0,8±0,697
DNMTB	FC	1	0,69	0,41	FC	1	1,15	0,67
	P value		0,805	0,838	P value		0,534	0,092
	Mean ± SD		0,7±1,587	0,4±1,776	Mean ± SD		1,1±1,229	0,7±1,199
PTEN	FC	1	0,75	0,47	FC	1	1,04	1,58
	P value		0,955	0,874	P value		0,636	0,806
	Mean ± SD		0,8±0,957	0,5±1,096	Mean ± SD		1±0,422	1,6±0,423

FC: Fold Change (Katsayı Değişimi); SD: Standart Deviation (Standart Sapma)

Çizelge 3.11. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarındaki DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ekspresyon düzeylerinin Gleason Skoruna göre karşılaştırmalı analizi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir (p<0.05).

	PCa						Met-PCa				
Gleason Skore		Kontrol	6	7	8	10		Kontrol	8	9	10
DNMT1	FC	1	15,41	18,83	15,16	24,74	FC	1	17,75	18,29	21,74
	P value		0,003	0,003	0,066	0,081	P value		0,00	0,00	0,00
	Mean ± SD		15±0,496	19±0,578	15±0,778	25±1,817	Mean ± SD		18±0,566	18±0,49	22±0,524
DNMT3A	FC	1	0,53	0,52	0,53	0,33	FC	1	0,30	1,89	2,58
	P value		0,36	0,241	0,215	0,433	P value		0,22	0,65	0,43
	Mean ± SD		0,5±1,099	0,5±1,176	0,5±1,482	0,3±5,274	Mean ± SD		0,3±0,774	1,9±0,691	2,6±0,709
DNMTB	FC	1	0,63	0,64	0,52	0,56	FC	1	0,34	1,18	1,48
	P value		0,854	0,882	0,969	0,65	P value		0,16	0,13	0,26
	Mean ± SD		0,6±1,491	0,6±1,504	0,5±1,748	0,6±5,56	Mean ± SD		0,3±1,263	1,2±1,197	1,5±1,206
PTEN	FC	1	0,72	0,68	0,73	0,44	FC	1	0,41	2,00	0,74
	P value		0,885	0,929	0,932	0,983	P value		0,91	0,99	0,94
	Mean ± SD		0,7±0,917	0,7±0,949	0,7±1,211	0,4±2,278	Mean ± SD		0,4±0,452	2±0,404	0,7±0,408

FC: Fold Change (Katsayı Değişimi); SD: Standart Deviation (Standart Sapma)

Çizelge 3.12. Kontrol, PCa ve Met-PCa gruplarındaki DNMT1, DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ekspresyon düzeylerinin TNM evreleme sistemine göre karşılaştırmalı analizi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir ($p<0.05$).

	PCA				Met-PCA				
T Evre		Kontrol	T2	T3		Kontrol	T3	T3/4	T4
DNMT1	FC	1	18,31	16,04	FC	1	10,41	24,66	10,55
	P value		0,002	0,003	P value		0,000	0,000	0,006
	Mean $\pm$ SD		18 $\pm$ 0,472	16 $\pm$ 0,618	Mean $\pm$ SD		10,4 $\pm$ 0,581	24,66 $\pm$ 0,517	10,6 $\pm$ 0,508
DNMT3A	FC	1	0,55	0,53	FC	1	0,28	2,29	1,37
	P value		0,255	0,374	P value		0,071	0,768	0,805
	Mean $\pm$ SD		0,5 $\pm$ 1,117	0,5 $\pm$ 1,156	Mean $\pm$ SD		0,3 $\pm$ 0,812	2,3 $\pm$ 0,714	1,4 $\pm$ 0,833
DNMTB	FC	1	0,74	0,50	FC	1	0,43	1,31	0,96
	P value		0,889	0,804	P value		0,451	0,127	0,261
	Mean $\pm$ SD		0,7 $\pm$ 1,46	0,5 $\pm$ 1,518	Mean $\pm$ SD		0,4 $\pm$ 1,274	1,3 $\pm$ 1,206	1 $\pm$ 1,32
PTEN	FC	1	0,76	0,62	FC	1	2,83	0,61	0,49
	P value		0,953	0,678	P value		0,389	0,762	0,792
	Mean $\pm$ SD		0,8 $\pm$ 0,932	0,6 $\pm$ 0,97	Mean $\pm$ SD		2,8 $\pm$ 0,499	0,6 $\pm$ 0,468	0,5 $\pm$ 0,527

FC: Fold Change (Katsayı Değişimi); SD: Standart Deviation (Standart Sapma)

Çizelge 3.13. Epi-miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki lineer regresyon analiz sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan değerler bold font olarak gösterilmiştir ($p<0.05$).

		Epi-miRNA'ların P Değerleri						Gen
PCa Grubu	Genler	miR-34b	miR-34c	miR-148a	miR-152	miR-200a	miR-200b	DNMT1
	DNMT1	0,004	0,034	0,001	0,009	0,011	0,002	
	DNMT3a	0,37	0,01	0,042	0,156	0,67	0,951	
	DNMT3b	0,043	0,023	0,007	0,022	0,127	0,305	
	PTEN	0,058	0,037	0,008	0,004	0,918	0,835	0,089
Met-PCa Grubu	Genler	miR-34b	miR-34c	miR-148a	miR-152	miR-200a	miR-200b	DNMT1
	DNMT1	0,951	0,127	0,016	0,002	0,979	0,001	
	DNMT3a	0,856	0,283	0,018	0,004	0,404	0,015	
	DNMT3b	0,057	0,054	0,002	0,007	0,077	0,001	
	PTEN	0,881	0,667	0,003	0,004	0,578	0,039	0,0001
Kontrol Grubu	Genler	miR-34b	miR-34c	miR-148a	miR-152	miR-200a	miR-200b	DNMT1
	DNMT1	0,609	0,624	0,812	0,211	0,089	0,141	
	DNMT3a	0,107	0,223	0,942	0,054	0,199	0,763	
	DNMT3b	0,06	0,051	0,578	0,261	0,05	0,86	
	PTEN	0,907	0,097	0,951	0,78	0,167	0,272	0,479



5. TARTIŞMA

miRNA ekspresyon profillerindeki değişiklikler, tümör progresyonu ve gelişimi, proliferasyon ve invazyon dahil pek çok histopatolojik özellik için biyobelirteç olarak kullanılabilmektedir [61]. Biyobelirteçler, belirli bir kanser türünde en etkili tedavi yöntemlerini değerlendirebilmek ve kanserin uzun vadeli sürecini veya tekrarlama ihtimalini öngörmeye oldukça faydalı bulunan araçlardır. Yeni bir miRNA sınıfı olarak kabul edilen epi-miRNA'lar, epigenomda yer alan düzenleyicileri hedef alarak epigenomu kontrol edebilir. Bu düzenleyiciler içerisinde yer alan enzimlerin ekspresyonunda gerçekleşen sapmalar, kanser progresyonuna neden olabilmektedir [62].

Epi-miR-34 ailesinin üç üyesi bulunmaktadır (miR-34a, miR-34b ve miR-34c) ve bu üç üyeden ikisi (miR-34b/c) aynı lokusu paylaşmaktadır [63-65]. Yapılan bir çalışmada prostat kanserinde epi-miR-34a'nın, JAG1/NOTCH1 sinyal yolağını direk olarak baskılayarak paklitaksel direncini azalttığı gösterilmiştir [66]. Ma ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada, prostat kanseri hücrelerinde, uzun kodlamayan RNA olan (lnc-RNA) DANCER'in miR-34a-5p/JAG1 sinyalini hedef alarak dosetaksel direncine neden olduğu gösterilmiştir [67]. Yine aynı çalışmada prostat kanseri kemoterapisinin regülasyonunda miR-34a-5p'nin önemli rol oynayarak olabileceği belirtilmiştir. Prostat kanseri hastalarının plazmalarında miR-34a ve 34b'nin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak önemli artışlar gösterdiği bulunmuştur. Yine serum PSA seviyesi ve Gleason skorunun miR-34a'nın ekspresyon seviyesi ile karşılaştırıldığında orta dereceli bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur [68]. Hasakova ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada, miR-34a ekspresyonunun, kanser dokusunda up-regüle edildiği ve bu yüksek miR-34a ekspresyonunun hastaların hayatta kalma süreci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [69]. Çalışmamızdaki hasta gruplarının her ikisinde de (PCa ve Met-PCa) epi-miR-34a-5p ekspresyon seviyesinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulduk. Bu artışın da GS ve tümör evresi ile ilişkili olduğunu bulduk. Epi-miR-34b/c'nin ise, tüm klinikopatolojik karakterler ile ilişkili olduğunu bulduk. Bu epi-miRNA'ların önemli ölçüde artmış olarak bulduğumuz ekspresyon seviyelerinin, yine bulduğumuz azalmış metilasyon yüzdeleri ile de bulgularımız desteklenmiştir.

Epi-miR-101, iki lokus tarafından kodlanan (miR-101-1 ve miR-101-2) ve pek çok kanser araştırmaları sırasında down-regüle edildiği için tümör süpresör olarak kabul edilen bir epi-miRNA sınıfıdır [70-72]. Epi-miR-101'in pek çok faktörden etkilendiğinden, downstream yolda hedefleri çok fazladır [71]. Çalışılan pek çok kanser türünde, epi-miR-101, bir tümör süpresör olarak belirtilmiştir. Ancak bazı prostat kanseri ile yapılan çalışmada, epi-miR-101'in up-regüle olarak bulunduğu gösterilmiştir [73]. Biz çalışmamızda, miR-101-2 ekspresyon seviyesinde önemli bir artış bulduk ve bu artışın GS ve tümör evresi korelasyonu ile ilişkili olduğunu bulduk. Ayrıca, promotor metilasyon yüzdelerinde bulunduğumuz önemli azalma, ekspresyon seviyesindeki bu artışla tutarlıydı. Farklı vücut sıvılarından ya da dokulardan izole edilen miRNA'ların gösterdiği farklı ekspresyon seviyelerine ve prognostik rollere sahip olabileceği düşünöldüğu zaman, epi-miRNA'ların biyobelirteç olarak kullanılması için klinik düzeyde daha fazla çalışma yapılması önemlidir.

Literatür taramasında, epi-miR-126'nın bir tümör süpresör gibi hareket ettiğini gösteren az çalışma vardır [74, 75]. Biz çalışmamızda PCa ve Met-PCa her iki hasta grubunda da GS/tümör evrelemesi ile epi-miR-126'nın ekspresyon seviyesi arasında hem orantılı hem de klinik olarak anlamlı artış gözlemledik. Bizimle uyumlu olarak Watahiki ve arkadaşlarının (2013) yapmış olduğu çalışmada, kastrasyon dirençli prostat kanseri (CRPC)'li hastalardan alınan plazma örneklerinde, epi-miR-126'nın ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre up-regüle edildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, epi-miR-126'nın yanı sıra miR-152'nin de metastatik evrede up-regüle edildiğini göstermişlerdir [76]. Epi-miR-152'nin ekspresyon seviyesi ile ilgili bulgularımız Watahiki ve arkadaşlarının sundukları verilerle uyumluluk göstermektedir. Bununla birlikte, mide kanseri (GC) hücre hattında yapılan çalışmalarda da miR-126'nın ekspresyon seviyesi yüksek bulunmuştur [77, 78]. Benzer şekilde, Hu ve arkadaşlarının sindirim sistemi kanserlerinde (DSC) yapmış oldukları çalışmada miR-126'nın bazı DSC'lerde onkojen olarak da hareket edebileceğini ve işlevine bakılmaksızın, düzenleyici etkilerini farklı hedef genler ve düzenleyici yollarla gösterebileceği gösterilmiştir [79]. Aynı çalışmada miR-126'nın DSC ağı üzerindeki önemi ve karmaşıklığı göz önünde tutulduğuunda, klinik rolünü tanımlamak ve farklı kanser türlerinde nasıl rol aldığını bulmak için miR-126'nın daha fazla araştırılmasının önemi vurgulanmıştir. Bütün bu verilere ek olarak, epi-miR-126'nın promoter metilasyon seviyesinde gözlemlediğimiz düşüş, ekspresyon

seviyesindeki artışı desteklemektedir. Bu durum, literatürde belirtilen epi-miR-126'nın prostat kanserinde bir tümör süpresör olarak kabul edilebilirliğini tartışmalı hale getirmektedir.

Erken evre, ileri evre ve kastrasyona dirençli prostat kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, epi-miR-140'ın ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak artış olduğu gösterilmiştir [80]. Liu ve arkadaşlarının çalışmasında (2019), prostat doku örneklerinde miR-140 down-regüle olduğu bulundu [81]. Bulgularımız, tümör evresiyle artan ekspresyon seviyesi ve buna paralel olarak promoter metilasyon yüzdelерinin azalmasına bağlı, miR-140'ın lokal/lokal ileri ve metastatik prostat kanserli hastaları takipte prognostik bir onko-miR biyobelirteç adayı olabileceğini gösterdi.

Prostat kanserinin erken, etkili tanı ve tedavisinde kullanılabilecek aday biyomarkerların bulunabilmesi için pek çok miRNA profillemeye çalışması yapılmıştır. Onkogenezinin moleküler yolağında yer alan ve önemli süreçleri yöneten epi-miR-148a'nın bazı kanser türlerinde ekspresyonunun bozulduğu bulunmuştur. Aynı zamanda miR-148a'nın bazı kanserlerde tümör süpresör etki gösterdiği de bulunmuştur. Yani onkogenik veya tümör süpresör olarak tanımlanabilir. miR-148a farklı kanserlerde farklı ekspresyon gösterdiği için bu konuda daha fazla çalışma gerektiğine dikkat çekilmiştir [82]. Szczyrba ve arkadaşları PCa'da miRNA profillemesine bakmış ve miR-375 için yaklaşık 9 kat, miR-148a için 5 kat ve miR-200c için 4-5 kat up-regüle olduğunu bulmuştur [70]. Benzer şekilde prostat kanseri dokusunda yapılan bir çalışmada miR-148a'nın up-regüle olduğu gösterilmiştir [83]. Bir diğer çalışmada, miR-148a'nın, NF-κB ve Stat3 aracılığıyla sinyal yolu iletimini baskılayan dolaylı bir tümör süpresör görevi yaptığı bulunmuştur [84]. Dybos ve arkadaşlarının 2018 yılındaki çalışmasında, artmış serum miR-148a-3p seviyelerinin prostat kanseri ile ilişkisi gösterilmiştir [85]. Murata ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir başka çalışma ise miR-148a'nın, hedef Cand1 ekspresyonunu baskılayarak LNCaP prostat hücre büyümesini destekleyen androjene duyarlı bir miRNA olduğunu ve PCa'da yeni terapötik hedefler olarak yararlı olacağını göstermiştir [86]. Biz de çalışmamızda hem PCa hem de Met-PCa hastalarında klinikopatolojik parametreler göz önüne alındığında epi-miR-148a'nın ekspresyon

seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulduk ve bu artış epi-miR-148a'nın promoter metilasyonundaki istatistiksel olarak anlamlı azalış ile desteklendi.

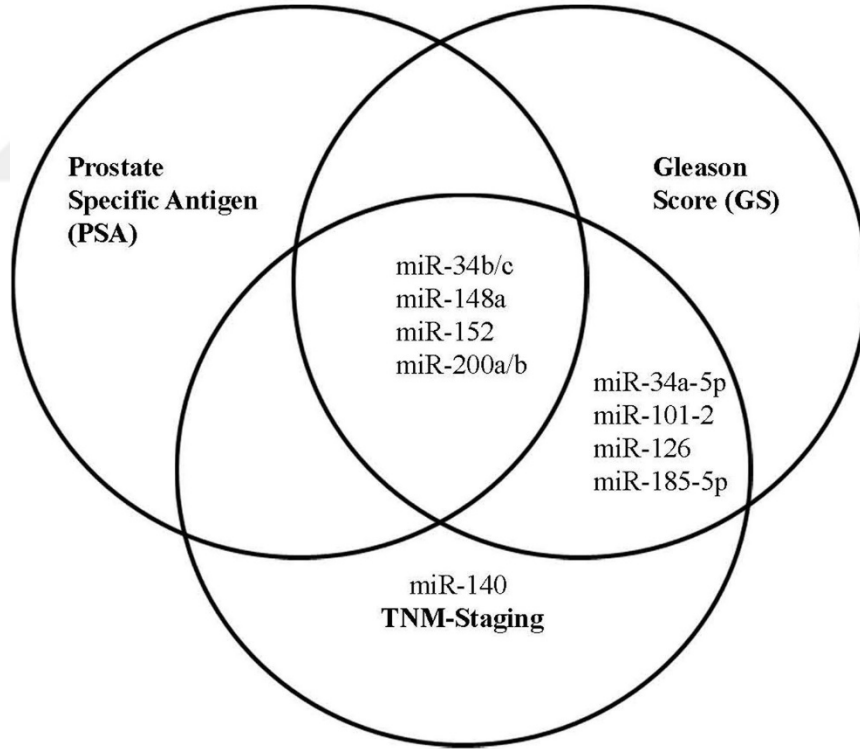
Epi-miR-152 prostat kanserinde çok az çalışılmış bir miRNA'dır. Liu ve arkadaşları, bazı kanser hücre hatları ve tümör dokularında yaptıkları çalışmada, miR-152'nin down-regüle olduğunu ve bu sebeple de tümör spresör özelliğe sahip olabileceğini belirtmiştir [87]. Benzer şekilde epi-miR-152'nin prostat kanserinde TGFa'yı hedefleyerek hücre göçü ve istilasını inhibe ettiğini ve bunun sonucunda bir tümör süpresör görevi gördüğü öne sürülmüştür [88]. Öte yandan, Matin ve arkadaşlarının 2018 yılındaki çalışması ile, prostat kanseri hastalarının plazmasında miR152-3p ekspresyonunun up-regüle edildiği bulundu [19]. Çalışmamızda, epi-miR-152'nin her iki hasta grubumuzda da tüm klinik parametrelerle ilişkili olduğunu ve ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olduğunu gözlemledik. Bu ekspresyon seviyesindeki önemli artış miRNA promoter metilasyonundaki azalış ile desteklendi.

Literatür taramasında genellikle miR-185-5p'nin bir tümör süpressör gibi davranan miRNA olduğu ve pek çok kanser türünde down-regüle edildiği bulunmuştur [89-91]. Prostat kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada epi-miR-185-5p'nin, kanser hücrelerinde aşırı ekspresyonunun, aynı anda apoptozu teşvik ederken anjiyogenezi de inhibe edebileceği vurgulanmıştır [92]. Prostat kanserinde yapılan çalışmada uzun kodlanmayan RNA olan RNCR3'ün, miR-185-5p'ye bağlanarak, kanserin ilerlemesine destek verdiği gösterilmiştir [93]. Kristensen ve arkadaşlarının 2016 yılındaki prostat kanserinde miRNA profillemesi ile yapılan çalışmasında Met-PCa'da miR185-5p ekspresyon seviyesinde artış olduğu ve bu artışın advers prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur [94]. Çalışmamızda, lokal/lokal ileri ve Met-PCa 'lı hastalarımızda GS ve tümör evrelemesi ile bağlantılı epi-miR-185-5p ekspresyon seviyesinde önemli ölçüde artış bulduk. Bu artışın da epi-miR-185-5p'nin promoter metilasyonundaki istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ile desteklendiğini gösterdik.

Yapılan çalışmalar, miR-200 ailesinin, tümörijeniz sürecinde önemli rol oynadığını göstermiştir. miR-200'ün aile üyelerinin Notch, Wnt ve TGF- β dahil olmak üzere farklı sinyal yollarını hedeflediği ve böylece migrasyon, adezyon, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) ve anjiyogenezi inhibe ederek agresif tümörlerde etkili

olduğu gösterilmiştir [95]. Guan ve arkadaşlarının yapmış olduğu doku çalışması miR-200a'nın BRD4/AR sinyal yolu boyunca PCa ilerlemesini baskıladığını gösterdi [96]. Williams ve arkadaşları miR-200b'nin PCa hücre hatları ve fare modelindeki fonksiyonel etkilerini araştırmış ve miR-200b'nin PCa'da EMT, hücre gelişimi ve metastazı önlediğini göstermiştir [97]. Bulgularımız miR-200a/b'nin ikili biyolojik etkiye sahip olduğunu, erken evrelerde onko-miR gibi davranırken, metastatik evrede tümör baskılayıcı gibi davrandığını göstermiştir. Bu sonuç, tek bir kanser türü içinde bile, bir miRNA'nın onkojenik veya tümör baskılayıcı olarak ikili rollerini vurgulamaktadır. Bu kopyalığın net bir şekilde anlaşılması, kanser tedavisinde olası miRNA hedeflerinin belirlenmesinde önemlidir.

Promoter metilasyon yüzdesi ve klinikopatolojik datalar (PSA, GS ve TNM) arasındaki korelasyonu gösteren miRNA'lar, **Şekil 5.1.**'de özetlenmiştir.



Şekil 5. 1. Promoter metilasyon seviyeleri ile klinikopatolojik veriler arasında korelasyon gösteren miRNA'lar [60]

Protein kodlayan genlerin ifadesi, miRNA ve epigenetik düzenleyiciler tarafından kontrol edilir. miRNA'lar ve epigenetik düzenleyicilerin karşılıklı ifadeleri ve etkileşimleri güçlü bir ağ devresi oluşturur. Bu genetik devreler, bir miRNA'nın bir epigenetik düzenleyiciyi inhibe ettiği ve bunu takiben aynı düzenleyici tarafından da baskılandığı çift negatif geri-besleme döngüsü (DNFL) ile düzenlenirler [56, 98]. Hücresel ortama duyarlı olan epi-miRNA devresi bir nevi "geçiş anahtarı" rolü üstlenip, homeostatik durumlarda rastgele hücre geçişlere güçlü bir stabilite sağlar [59]. Reale ve arkadaşları, miR'lerin, epigenetik düzenleyici genlerle karşılıklı etkileşerek düzenleyicilik potansiyellerini güçlendirdiğini göstermişlerdir [59]. Aynı miR'in, belirli bir hücre hattında bir epi-miR gibi davranırken, başka bir hücre hattında hiçbir epigenetik etki göstermeyebileceğini de bulmuşlardır. Bu bağlamda, klinikte kansere ve belki de kişiye özgü tedavinin başarısı için "epi-miRNome" önem arz etmektedir. Özellikle, aynı dokudaki hücreler ve/veya aynı tür tümörlerden türemiş hücreler arasında ne kadar benzerlik olduğunu ve hastalığın etyopatogenezi aydınlatmak için epi-miR'ler dikkate değerdir.

DNMT1'in ekspresyonundaki artış çeşitli kanserlerde gösterilmiştir [42, 43, 99-101]. Prostat kanseri ve benign prostat epitel hücre hattında DNMT1 mRNA ifadesinin arttığı gösterilmiştir [102]. DNMT1'in artan ekspresyonunun mesane nodüler invaziv karsinomların gelişme ve pre-kanseröz aşamalarında ürotelyal karsinogenez ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [99, 101]. Çalışmamızda, PCa ve Met-PCa gruplarında DNMT1 geninin ifadelenme düzeyinde anlamlı artış; DNMT3a, DNMT3b ve PTEN gen ifadelenme düzeyinde ise anlamlı azalış bulduk ($p < 0.05$). Literatürde bizimle benzer şekilde DNMT1 enziminin kanserde artmış ekspresyonunu gösteren çok sayıda çalışma olduğu gibi, farklı sonuçlar bulan araştırmalar da vardır. Bu farklılığın nedenlerinden biri DNMT1 aşırı ekspresyonunun, artmış kanser hücresi proliferatif aktivitesinin ikincil bir etkisi olmadığı, aynı zamanda bu enzimde meydana gelen mutasyonlar ile olabileceğidir [42, 103-105]. Her iki hasta grubumuzdaki PTEN geninin ekspresyonundaki azalma ve DNMT1 ekspresyonundaki artma, literatür ile uyumluluk göstermektedir. Bu sonucumuz, DNMT1'in PTEN promotor hipermetilasyonuna neden olarak bu genin ekspresyonunda azalmaya neden olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda, yüksek ifadelendiğini bulduğumuz DNMT1, PTEN ifadelenmesini down-regüle etmiş ve DNMT1-PTEN arasındaki antagonist ilişki sadece Met-PCa grubumuzda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuç metastatik evrede DNMT1'in PTEN geni üzerinde daha fazla etkili olduğunu ve DNMT1/PTEN görelî ifadelenmesinin kötü prognozla ilişkilendirilebileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, Düşük PTEN ekspresyonu ile birlikte yüksek DNMT1 ekspresyonunun, Met-PCa'lı hastalarda genel sağkalım için kötü prognostik belirteçler olabileceğini tanımladık. Bu sonucumuz, metastatik süreçte, PTEN supressör geninin DNMT1'e ilave başka epigenetik düzenleyici enzimlerin hedefi olabileceğini, belki de bunun heterozigotluk kaybı, allellik delesyon gibi çoklu değişimlere yol açabildiğini düşündürmüştür. Bir başka deyişle, DNMT1 ekspresyon düzeyinin artışına eşlik eden PTEN azalması erken evre prostat kanserinde belki de nadir olup, ancak tümör ilerlemesi ile sıklıkta karşımıza çıkabilir. Hastaların klinikopatolojik verilerine göre sınıflandırılarak değerlendirilmesi sonucunda, her iki grupta da sadece DNMT1'de anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.01$). Qi ve arkadaşlarının [106], mesane kanserinde yapmış oldukları çalışmayla uyumlu olarak, DNMT1 enziminin sadece prostat kanserinde hasta grupları arasında (PCa ve Met-PCa) değil, aynı zamanda klinikopatolojik özellikler (PSA, GS ve TNM) dikkate alındığında da anlamlılık gösterdiğini bulduk ($p<0.01$). Tüm klinikopatolojik evreler açısından sadece DNMT1 geninin istatistiksel olarak anlamlılık göstermesi, prostat kanserinin başlangıcından, ilerlemesi de dahil her evresinde bu genin aktif olarak görev aldığını ve önemlilik derecesini kanıtlamaktadır. Sonucumuz, DNMT1'in terapötik hedef ve biyomarker adayı olma potansiyelini göstermektedir.

DNMT'ların prostat kanserinde klinikopatolojik özelliklere göre ilişkilendiren bir çalışmaya literatürde rastlamadığımız için sonuçlarımızın bu kısmını karşılaştıramadık.

DNMT3b [107] ve DNMT3a'nın [108] meme kanserinde uygun tanısal ve terapötiklerin geliştirilmesinde hedef potansiyeli olabilecekleri gösterilmiştir. Hipofiz adenomlarında, tümör baskılayıcı genleri hedef alan DNMT1 ve DNMT3a'nın up-regüle olduğu ve bunun agresif tümör davranışı ve yüksek metilasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur [109]. DNMT1'in renal hücreli karsinomda tümör büyüklüğü, klinik evre, histolojik derecelendirme, lenf nodu metastazı, vasküler invazyon,

rekürens ve prognoz ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur [110]. DNMT'lar ürolojik kanserlerde de araştırılmıştır [111-113]. Hemen hemen her çalışma, yeni antikanser terapötiklerin keşfinde metilasyon örüntüsünün önemine dikkat çekmiştir.

NKX3.1, prostatik epitel spesifikasyonu, uygun farklılaşma ve luminal kök hücreler için önemli bir homeobox gendir. Aynı zamanda bu gen prostat kanserinde en sık delesyona uğrayan bir gatekeeper supressördür [114]. Bowen ve arkadaşları [114], NKX3.1 kaybının fare prostat epitel hücre proliferasyonunu arttırdığını, ancak bu farelerde NKX3.1 mRNA'sının, PTEN ifadesini etkilemediğini göstermişlerdir. Bu nedenle, tümör supressörleri olan PTEN ve NKX3.1'in etkileşimi PTEN kaybından sorumlu olabileceğini söylemişlerdir. NKX3.1'in işlev kaybının, anormal hücresel plastisite ve hücresel farklılaşmanın bozulması yoluyla enflamasyona bağlı prostat kanserine neden olduğu fare modelinde gösterilmiştir [115].

Çalışmamızda, her iki grubumuzda kontrole göre NKX3.1 gen ifadelanmesinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Literatürden farklı olan sonucumuzun en önemli sebebi çalışmamızda fare dokusu yerine, insan serumunu kullanmış olmamız olabilir.

Majid ve arkadaşları [116], prostat kanseri ksenograft fare modelinde, miR-34b'nin doğrudan Akt'yi ve onun aşağı akış genlerini hedefleyerek hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu, göç/istilayı inhibe ettiğini ve hücre döngüsünü G0/G1'de durdurarak apoptozu uyardığını göstermişlerdir [116]. Aynı çalışmada miR-34b'nin yeniden yapılandırılması -artan ekspresyonu- DNMT'ları, HDAC'ları down-regüle ederek kısmi demetilasyon ve aktif kromatin modifikasyonları indüklediği gösterilmiştir. Shiina ve arkadaşları [117], PCa'lı Afrikalı-Amerikalılarda miR-34b'nin down-regülasyonunun androjen reseptör (AR)'ünü up-regüle ettiğini ve bunun ırkla ilişkili tümörjenezde katkıda bulunduğunu söylemişlerdir. Öte yandan, düşük düzeyde bulunan bu ekspresyonların allelik delesyonlar ve/veya heterozigotluk kaybı nedeniyle olabileceğini de göz ardı etmemek gerekir. Bu çalışmalarının tersine, Chamani ve arkadaşları [118] nanozomal dendrokürkümün ile tedavi edilen hepatoselüler kanser hücrelerinde, DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b ifadelanmesinin down-regüle edilirken; miR-34a, 34b ve 34c'nin up-regüle edildiğini bulmuşlardır. Bir başka deyişle, miR-34 ekspresyon seviyesi ile epigenetik değiştirici enzimlerinden

DNMT'lar arasında ters orantı olduğunu göstermişlerdir. Önceki sonuçlarımızda, miR-34b ve miR-34c'nin promotor metilasyon yüzdesinin PCa ve Met-PCa grubunda düştüğünü ve bu hipometilasyon artan miR-34b/c ekspresyon seviyesi ile sonuçlandığını göstermiştik. Ayrıca, yüksek miR-34b/c seviyelerinin PSA, GS ve TNM evrelemesi ile doğru orantılı olarak ilişkili olduğunu da gösterdik. Çalışmamızın devamında ise, literatürle uyumlu olarak, yüksek düzeyde ifadelenen miR-34c'nin hedef genleri olan DNMT3a, 3b ve PTEN arasında ters orantılı bir ilişki olduğunu gösterdik ($p<0.05$). PCa hasta grubumuzda yüksek DNMT1 seviyesine yüksek miR-34b ve miR-34c seviyelerinin eşlik ettiğini bulduk ($p<0.05$). Bu sonucumuz, DNMT1 geninin mutasyona uğradığı için miR-34b/c'nin ekspresyon seviyesini arttırabileceğini düşündürmüştür. Öte yandan, yüksek DNMT1 seviyesine yüksek miR-34b ve miR-34c seviyelerinin eşlik ettiği sonucumuz, Majid ve arkadaşlarının bulgusu ile örtüşmemektedir. Bunun sebebi, miR-34b'nin pleiotropik rolü olabileceği gibi çalışma protokolüne dahil edilen doku kaynaklarının farklı olması, örneklem seçimi, sayısı, etnik farklılıklar, DNMT1 enzimidaki mutasyonlar ve bu enzimin farklı miRNA'lar ya da genlerle kontrol edilmesi sayılabilir. Met-PCa grubumuzda ise miR-34b/c ile hedef genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Bulgularımız, miR-34c'nin PCa'nın "erken" dönemlerinde DNMT1'in ifadenmesini arttırıp, PTEN genini baskılayarak yeni bir düzenleyici yol "miR-34c-DNMT1-PTEN" nin potansiyel diagnostik ve prognostik hedef olabileceğini düşündürmüştür.

Sengupta ve arkadaşları [119], hormona dirençli prostat kanseri hücre hatlarında miR-148a ektopik ekspresyonunun DNMT1 ekspresyonunu baskılayarak apoptozu indüklediğini ve miR-148a ve DNMT1 arasında antagonist ilişki olduğunu söylemişlerdir. miR-148a'nın DNMT1 ve DNMT3b'nin kodlama bölgesine bağlanarak bu genlerin ifadenmelerini düzenlediği gösterilmiştir [120, 121]. Braconi ve arkadaşları [121], miR-148a ve miR-152 öncüllerinin, DNMT1 protein ifadenmesini azaltarak metilasyona duyarlı tümör baskılayıcı genlerden Rassf1a ve p16INK4a ifadenmesini artırdığını ve böylelikle insan kolanjiyokarsinom hücre hattında proliferasyonunu önleyebileceğini göstermişlerdir. Hamilton ve arkadaşları [122], PCa'da, miR-148a'nın hem onkojenleri hem de PTEN gibi tümör baskılayıcıları hedef aldığını ve hastalığın aşamasına göre ekspresyon seviyesinin değişim gösterdiğini bulmuşlardır [122]. Li ve arkadaşları da [82], miR-148a-3p'nin

bazı kanserlerde yukarı ve diğerlerinde aşağı regüle edildiğini göstermişlerdir. Hua ve arkadaşları [123] miR-148a'nın glioblastomda, Ma ve arkadaşları ise [124] osteosarkomda up-regüle olduğunu ve yüksek miR-148a seviyesinin kanserin agresifliğini yansıttığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, miR-148a'nın, PTEN'i hedefleyerek fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal yolunun aktivasyonuna yol açtığı osteosarkomalarda gösterilmiştir [125]. Başka bir çalışmada, miR-148a'nın PTEN ekspresyonunu inhibe ederek β -katenin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [126]. Dybos ve arkadaşları [85], miR-148a-3p'nin sağlıklı kontrollere kıyasla PCa'inde up-regüle edildiği göstererek, miR-148a-3p'nin vücuttaki enfeksiyonlar gibi genel bir dengesizlik belirtecinden çok daha fazlası olduğunu söylemişlerdir. Tüm bu bulgular, PCa gelişiminde miR-148a'nın aşırı ekspresyonunun potansiyel rolüne dikkat çeken hipotezimizi desteklemektedir. PCa ve Met-PCa gruplarımızda, literatürle uyumlu olarak, hipometile olan miR-148a'nın hedef genleri DNMT3a, 3b ve PTEN ile ters orantılı olarak etkileşirken; literatürden farklı olarak, DNMT1 ile doğru orantılı olarak etkileştiğini bulduk. Her iki hasta grubumuzda yüksek DNMT1 seviyesine yüksek miR-148a seviyesinin eşlik ettiğini bulduk ($p<0.05$). Bu sonucumuz, DNMT1 geninin mutasyona uğradığı için miR-148a'nın ekspresyon seviyesini arttırabileceğini düşündürmüştür.

Met-PCa grubumuzda, DNMT1 ve PTEN genleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulduk ($p<0.05$). miR-148a'nın artmış ekspresyonu için olası bir mekanizma, muhtemelen onko-miR doğası nedeniyle bu miRNA'nın tümör dokularında transkripsiyonu uyaran miR-148a konak gen promotörünün hipometilasyonudur. miR-148a'nın, DNMT1'i hedefleyerek PTEN ekspresyonunu aşağı düzenlediğini bulduk. Elbette PTEN aktivitesi epigenetik susturma ve mutasyonlar dışında; transkripsiyonel baskı, anormal protein lokalizasyonu ve translasyon sonrası modifikasyonlar gibi çeşitli yollarla da düzenlenebilir. Bulgularımız, DNMT1 geninin, PTEN'in yukarı kaskadında olduğunu ve PCa'nın metastazını destekleyen promoter hipermetilasyon yoluyla PTEN'i aşağı doğru düzenlediğini göstermiştir. DNMT1 ve PTEN genleri arasındaki bağlantının hastalığın metastatik evresinde anlamlı olması ise metastatik durumda tümör supressör gen delesyonunda olaya dahil olabileceğini düşündürmüştür.

PCa patogenezinde anahtar rollere sahip genleri hedefleyen bir diğer kodlanmayan

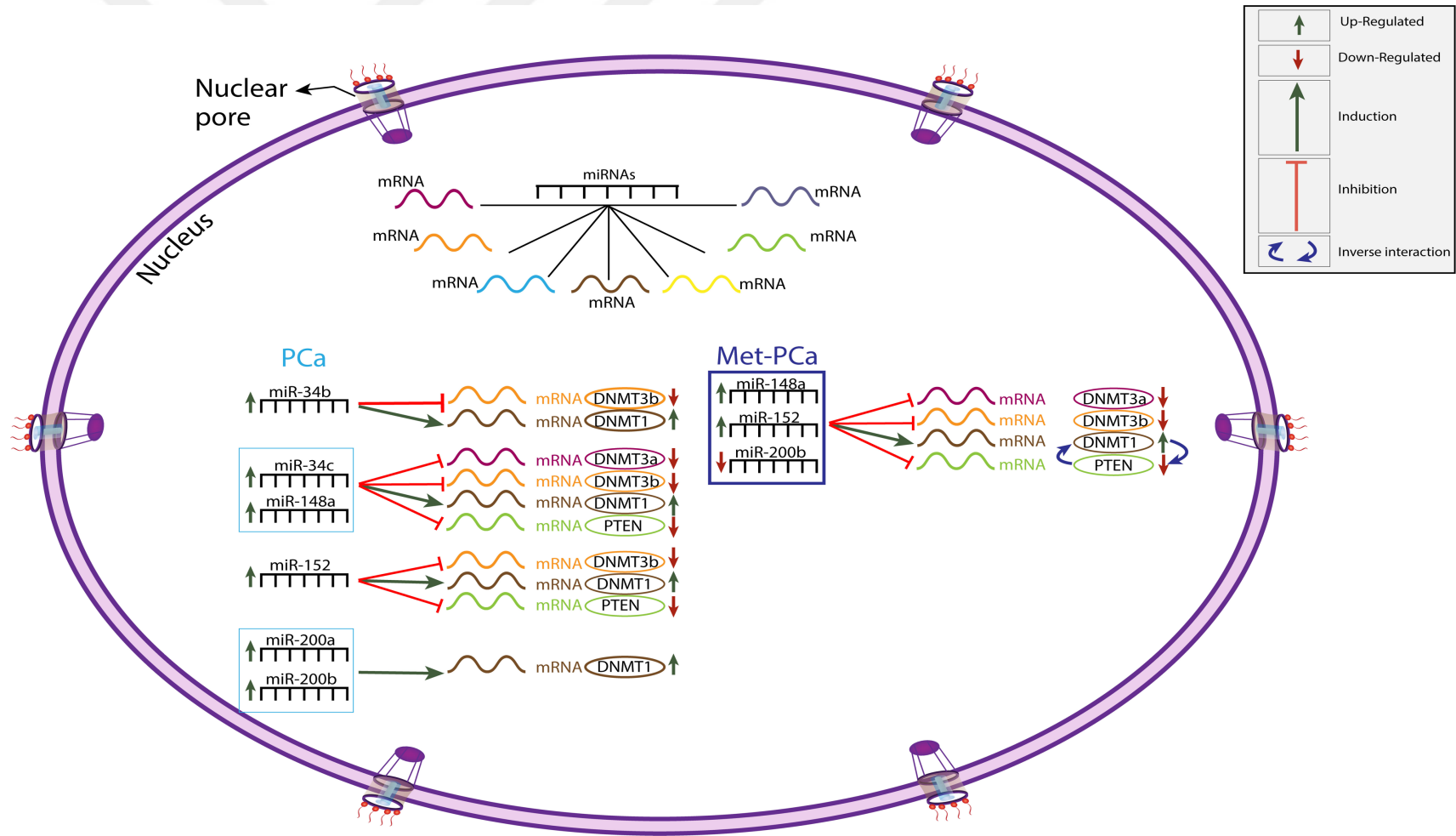
RNA da miR-152'dir. miR-152 ifadelenme seviyesinin yüksek Gleason dereceli PCa'li dokularda önemli ölçüde azaldığı gösterilmiş ve düşük ekspresyonu ileri patolojik aşamalarla ilişkilendirilmiştir [88, 127]. Theodore ve arkadaşları [127], PCa'li hücre hatlarında, miR-152'nin yüksek metilasyon profili göstererek ekspresyonunun azaldığını, DNMT1'in ise ekspresyonunun arttığı göstermişlerdir. Aynı çalışmada, miR-152/DNMT1 epigenetik regülasyonun özellikle Afrikalı-Amerikalılarda olmak üzere, PCa tümörlerinin agresifliğine katkıda bulunan çoklu olaylarda önemli bir rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Bir başka çalışmada, PCa'inde miR-152 ekspresyon seviyesinin azaldığını ve bunun yüksek metilasyon profili nedeniyle gerçekleştiği gösterilmiştir [128]. Öte yandan, yüksek plazma miR-152 seviyeleri, akciğer, kolorektal ve meme kanseri gibi diğer kanserler için tanısal bir biyobelirteç olarak önerilmiştir [129]. Marin ve arkadaşları [19], miR-152-3p'nin aşırı ekspresyonunun, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü arttırdığını göstermişlerdir. Moya ve arkadaşları [130], PCa için mevcut PSA biyobelirtecinin tanısal gücünü geliştirme potansiyeline sahip 4 adet plazma miRNA'sından birinin yüksek ifadelenen miR-152 olduğunu belirlemişlerdir. Önceki çalışmamızda, miR-152'nin promotör hipometilasyonu sonucunda ekspresyonunda artış olduğunu hem PCa hem de Met-PCa'lı grubumuzda anlamlı bulmuş, üstelik bu artışı PSA, GS ve TNM evrelemeleri ile doğru orantılı ilişkisini de göstermiştik [60]. Bulgularımız, Zhu ve arkadaşları [88], Theodore ve arkadaşları [127] ve Ramalho-Carvalho ve arkadaşları [128]'nin sonuçları ile çelişmektedir. Bunun sebepleri, saptanan miRNA seviyeleri, özellikle serum örneklerinde uygulanan ekstraksiyon metodolojisine (numune toplama, numune alma, işleme ve depolama gibi ön ekstraksiyon adımları, kullanılan dahili kontroller), örneklem sayısına, doku tipine ve ırksal farklılıklara bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmesidir. Ayrıca, miRNA salgılanmasının seçici bir süreç olmasından ötürü dolaşım düzeylerinin hücre içi düzeylerinin gerçek bir yansıması olmadığıdır [131]. Ek olarak, pıhtılaşma sürecinin kandaki hücre dışı miRNA'lar üzerindeki bilinmeyen etkilerine bağlı olarak plazmadan ziyade serumdaki miRNA konsantrasyon seviyeleri gözlenmiştir, bu da farklı örneklerdeki miRNA düzensizlikleriyle ilgili karşılaştırmaları daha da zorlaştırmaktadır. Örneğin miR-152, kontrollere kıyasla mesane kanseri hastalarından alınan serumda [132] yukarı regüle edilirken, farklı bir çalışmada, sağlıklı bireylere kıyasla mesane kanseri dokusu hastalarında aşağı regüle edildiği bulunmuştur [133]. Bununla birlikte, ekzozomal miR olduğu bilinen miR-152'nin,

muhtemelen ekzozomal kaçış yoluyla üretim sahası dışında uzak bölgedeki metastatik rolüne bir ipucu da olabilir [134, 135]. Prostat kanseri hücrelerinden türetilen ekzozomlar, kanserin kemorezistansına da katkıda bulunuyor olması [135], bulduğumuz yüksek miR-152 ifadenmesinin metastatik evrede bu direnç yüzünden daha da up-regüle olması, hatta belki de PTEN kaybına yol açması sonucumuzu desteklemektedir. Ayrıca, bazı miRNA'lar tümör hücreleri tarafından Argonaute (AGO) bağlı kompleksler [136] olarak veya apoptotik cisimlerdeki ölü hücrelerden salınır, böylece miRNA'ların bir kaynağı da tümör hücreleridir. Belki de PCa'da yüksek bulduğumuz miR-152'lerin kaynağı PCa hücreleridir. Bizimle benzer olarak, Chen ve arkadaşları [129] onko-miR olan miR-21 ile tümör süpresör miR-152'nin plazma değerlerine bakmış ve her iki miR'in de ekspresyonunun arttığını bulmuştur. PCa ve Met-PCa gruplarımızda miR-152'nin up-regülasyonu DNMT1'in up-regülasyonu ile, bunun tersine DNMT3b ve PTEN'in down-regülasyonu ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkili olduğunu bulduk ($p < 0.01$). miR-152'nin, PTEN mRNA'sının 3'UTR'sini hedefleyerek PTEN ekspresyonunu inhibe ettiğini gösteren Huang ve arkadaşlarının [137] nazofarenks karsinomu çalışması ile bulgularımız uyumluluk göstermiştir. Her iki grubumuzda, miR-152 ve PTEN arasında ters orantılı ilişki bulduk ($p < 0.01$). Ayrıca, yine her iki grumuzda, miR-152 ve DNMT1 ekspresyonu arasında anlamlı artış bulduk. Bu sonucumuz, DNMT1 geninin mutasyona uğradığı için miR-152'nin ekspresyon seviyesini arttırabileceğini ve bununla PTEN promotor metilasyonuna neden olduğunu düşündürmüştür. Prostat kanseri ile ilgili "mir-152-DNMT1-PTEN" yolağı çalışması mevcut olmadığından sonuçlarımız bu bağlamda başka bir veri ile karşılaştırılamamıştır.

miRNA-200 ailesinin epigenetik modifikasyondan kaynaklanan down-regülasyonu, PCa'inde potansiyel bir tümör-supressör miRNA olduğunu göstermiştir [138]. İfadelenme düzeyi az olan miRNA-200 ailesi, epitelden mezenkime geçişi (EMT) sürdürmedeki rolleriyle en iyi bilinen, çinko parmak E homeobox bağlayıcı transkripsiyon faktörleri olan ZEB1 ve ZEB2'nin up-regülasyonuna sebep olur [139]. miR-200a ve b'nin, PTEN gen ekspresyonunu baskılayarak endometriyal kanser hücrelerinin büyümesine sebep olduğu in vitro olarak gösterilmiştir [140]. Endometriyal kanserde yapılmış bir başka çalışmada, miR-200a, miR-200b ve miR-429'un PTEN'i hedefleyen onko-miR'ler olduğu bulunmuştur [141]. Suo ve arkadaşları [142], over kanserli doku ve hücre hatlarında aşırı ifadelenen miR-

200a'nın PTEN ifadenmesini inhibe ettiğini ve bu kanser türü için karsinojenik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. miR-200a/b'nin hedef genleri arasında DNMT3a, DNMT3b ve DNMT1 olduğu da gösterilmiştir [108, 143]. miR-200b ve miR-200c-aracılı DNMT'lerin down-regülasyonunun, cisplatin direncini tersine çevirerek overan kanser hücrelerinin kemoterapötik duyarlılığını artırdığı in vivo olarak gösterilmiştir [144]. Zeng ve arkadaşları [145], DNA replikasyonu, eksizyon onarımı ve telomer bakımında önemli bir gen olan Flap endonükleaz 1 (FEN1)'in DNMT1 up-regülasyonuna yol açtığını, bunda miR-200a'nın down-regülasyonu ile bağlantılı olduğunu meme kanseri hücre hattında göstermişlerdir. Literatürde, miR-200 ailesinin genellikle kansere özgü davrandığını, bazı kanserlerde ekspresyonu artarken bazı kanserlerde ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Önceki çalışmamızda, lokal/lokal ileri ve metastatik PCa'da, miR-200a/b ailesinin pleiotropik etkisini bulmuştuk [60]. Lokal/lokal ileri PCa grubumuzda, promotör hipometilasyonu sebepli miR-200a ve miR-200b ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlerken; metastatik grupta promotör hipermetilasyon sebepli düşük ekspresyon seviyeleri gözlemledik. Birbaşka ifadeyle, miR-200a/b'nin PCa'nın erken aşamasında bir onko-miR gibi ancak; ileri evre metastatik durumda tümör supresör- miR gibi davrandığını belirledik [60]. Çalışmamızın devamında ise, Met-PCa'da miR-200b'nin down-regülasyonunun araştırdığımız tüm hedef genler ile aralarında anlamlı bir ilişki olduğunu saptadık ($p<0.05$). Metastatik grupta, promotör hipermetilasyonu sonucu down-regüle olan miR-200b'nin, hedef genleri DNMT3a, DNMT3b ve PTEN ile agonist, ancak, DNMT1 ile antagonist etkileştiğini gösterdik ($p<0.05$). Ayrıca, sadece PCa hasta grubumuzda miR-200a'nın up-regülasyonuna, DNMT1'in yüksek ifadenmesi eşlik etmiştir.

miRNA'lar ve epigenetik mimari arasındaki karmaşık ilişki, kanserdeki gen ekspresyon profillerini izlemek için önemli bir özelliktir. miRNA'lar ve epigenetik örüntü arasındaki "epi-miR-epi" üç taraflı geri besleme ilişkisi, epigenetik modifiye edici enzimleri hedefleyebilir [56]. Çalışmamız, miR-34b/c, miR-148a, miR-152 ve miR-200a/b epi-miRNA'larının ve hedef genleri arasında olan DNMT'lar, PTEN ve NKX3.1'in prostat kanser gelişiminde lokal ve metastatik evrelerindeki prognostik farklı etkilerini gösteren ilk epi-miR-epi hedef gen sinyal yolağını gösteren çalışmadır. Çalıştığımız epi-miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki ilişkiyi gösteren bulgularımız **Şekil 5.2.** de özetlenmiştir.



Şekil 5. 2. Grafik özeti

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Genel olarak, çalışılan 30 miRNA arasında miR-34a-5p, miR-34b/c, miR-101-2, miR-126, miR-140, miR-148a, miR-152 ve miR-185-5p'nin metilasyon profilleri, PCa progresyonunun tahmininde umut verici bir biyomarker adaylarıdır. Ayrıca, miR-200a/b PSA, GS ve TNM evresi açısından değerlendirildiğinde PCa'nın erken aşamasında bir onko-miR gibi davranabiliyorken, ileri evre metastatik örneklerde tümör baskılayıcı görevi görüyor olabilir. PCa'da aday miRNA biyomarker modellerinin değerlendirilebilmesi, klinikopatolojik değişkenlerin de hesaba katılmasıyla birlikte, PCa'nın tanısında doğruluğu daha da artıracaktır. Ayrıca, epigenomik düzeyde miRNA ekspresyonunun çalışılması, belirli bir kanser türü için en etkili tedavi yöntemlerini değerlendirmemize, daha sonra da kanserin uzun vadeli öngörüsü ya da rekürensini belirleyebilmemize izin verebilir.

Bu tez çalışmamız ayrıca, DNMT1-PTEN' ifadenmelerini hedef alan miR-148a, miR-152, miR-200b'nin güçlü ve ayırt edici birer biomarker adayı ve özellikle ileri evre prostat kanserinde prediktif, prognostik ve terapötik hedef olabileceğini göstermiştir. Prostat kanserinde tanısal ve prognostik biyobelirteçler olarak miRNA'ların ve metilasyon sürecinin ve bu süreçte yer alan genlerin mRNA ve miRNA ifade profillerinin bütünleştirici analizine dikkat çekmesi açısından yeni, öncü ve önemli bir çalışmadır. Bununla birlikte, prostat kanserli hastalarda hızlı tanı ve tedavi için epi-miRNA'lar ve bu mekanizmada yer alan ilgili enzimlerin biyobelirteç olarak kullanılabilir potansiyeline dikkat çekmektedir. Prostat kanser gelişim sürecinin her basamağında bu hedefler dikkate alınarak oluşturulan yeni tedavi yöntemleri kliniğe yansıtılarak bu alanda kliniğe önemli katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. PCa'da, tümör baskılayıcı-miR, onko-miR ve/veya metasta-miR örüntüsü içinde PTEN'in DNMT1 ile etkileşimini açıklayabilmek için daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

1. Roy, P. S., and Saikia, B. J. (2016). Cancer and cure: A critical analysis. *Indian journal of cancer*, 53(3), 441–442. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>
2. Nenclares, P., and Harrington, K. J. (2020). The biology of cancer. *Medicine*, 48(2), 67-72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.001>
3. Lustberg, M. B., and Ramaswamy, B. (2009). Epigenetic targeting in breast cancer: therapeutic impact and future direction. *Drug news perspectives*, 22(7), 369-381. <https://doi.org/10.1358/dnp.2009.22.7.1405072>
4. Wu, Y., Sarkissyan, M., and Vadgama, J. V. (2015). Epigenetics in breast and prostate cancer. *Methods in molecular biology*, 1238, 425-466. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_23
5. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
6. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
7. Fouad, Y. A., and Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, 7(5), 1016-1036.
8. Wang, J. J., Lei, K. F. and Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(12), 3855-3864. https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15270
9. Sendogan, Furkan., Turan, Turgay., Güzel, Rasim., Efiloglu, O., Danacioglu, Y.O., Atis, Ramazan., Caskurlu, Turhan., ve Yildirim, Asif. (2019). Türkiye'deki Ürologların Benign Prostat Hiperplazisi Tedavisindeki Güncel Yaklaşımları. *Yeni Üroloji Dergisi*. 105-113. <https://doi.org/10.33719/yud.582670>
10. Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World journal of oncology*, 10(2), 63-89. <https://doi.org/10.14740/wjon1191>
11. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., and DePinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes development*, 32(17-18), 1105-1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
12. Konaç E., and Sözen. S. (2014). Molecular Biology in Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *Bulletin of Urooncology*, 13, 228-235. Doi: [10.4274/uob.194](https://doi.org/10.4274/uob.194)

13. Bidarra, D., Constâncio, V., Barros-Silva, D., Ramalho-Carvalho, J., Moreira-Barbosa, C., Antunes, L., Maurício, J., Oliveira, J., Henrique, R., and Jerónimo, C. (2019). Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Metastasis Development Prediction. *Frontiers in oncology*, 9, 900. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00900>
14. Sungur, M., and Caliskan, S. (2020). Awareness of prostate cancer diagnosis and management among Turkish males: a cross sectional study from Çorum. *The aging male* 23(3), 202–205. <https://doi.org/10.1080/13685538.2019.1577377>
15. Malik, S. S., Batool, R., Masood, N., and Yasmin, A. (2018). Risk factors for prostate cancer: A multifactorial case-control study. *Current problems in cancer*, 42(3), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2018.01.014>
16. Prcic, A., Begic, E., and Hiros, M. (2016). Usefulness of Total PSA Value in Prostate Diseases Diagnosis. *Acta informatica medica*, 24(3), 156-161. <https://doi.org/10.5455/aim.2016.24.156-161>
17. Filella, X., Fernández-Galan, E., Fernández Bonifacio, R., and Foj, L. (2018). Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 11, 83–94. <https://doi.org/10.2147/pgpm.S136026>
18. Bickers, B., and Aukim-Hastie, C. (2009). New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era. *Anticancer Research*, 29(8), 3289-3298.
19. Matin, Farhana., Jeet, Varinder., Moya, Leire., Selth, Luke., Chambers, Suzanne., Clements, Judith., and Batra, J. (2018). A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 8(1), 6653. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24424-w>
20. Jerónimo, C., Varzim, G., Henrique, R., Oliveira, J., Bento, M. J., Silva, C., Lopes, C., and Sidransky, D. (2002). 1105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer epidemiology biomarkers prevention*, 11(5), 445–450.
21. İnternet: World Health Organization-Cancer Profiles, 2020. Web: <https://gco.iarc.fr/> adresinden 4 Mart 2021 tarihinde alınmıştır
22. Rebbeck, T. R. (2017). Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Seminars in Radiation Oncology*, 27(1), 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2016.08.002>
23. Wallis, C. J. D., and Nam, R. K. (2015). Prostate Cancer Genetics: A Review. *The journal of the international federation of clinical chemistry and laboratory medicine*, 26(2), 79-91.
24. Frame, F., Noble, A., Klein, S., Walker, H., Suman, R., Kasprowicz, R., Mann, V.M., Simms, M., and Maitland, N. (2017). Tumor heterogeneity and

- therapy resistance - implications for future treatments of prostate cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 3, 302-314. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.34>
25. Gandhi, J., Afridi, A., Vatsia, S., Joshi, G., Joshi, G., Kaplan, S. A., Smith, N. L., and Khan, S. A. (2018). The molecular biology of prostate cancer: current understanding and clinical implications. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 21(1), 22–36. <https://doi.org/10.1038/s41391-017-0023-8>
 26. Zhu X and Wetta H. Genetics and Epigenetics in Tumorigenesis: Acting Separately or Linked? (2014). *Austin Journal of Clinical Medicine*, 1(3), 1016.
 27. Kanwal, R., Gupta, K., and Gupta, S. (2015). Cancer epigenetics: an introduction. *Methods Molecular Biology*, 1238, 3-25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1
 28. Waddington, C. H. (1942). The epigenotype. *Endeavour*, 1, 18–20.
 29. Goldberg, A. D., Allis, C. D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 128(4), 635-638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
 30. Weinhold, B. (2006). Epigenetics: the science of change. *Environmental health perspectives*, 114(3), 160-167. <https://doi.org/10.1289/ehp.114-a160>
 31. Handy, D. E., Castro, R., and Loscalzo, J. (2011). Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation*, 123(19), 2145-2156. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>
 32. Nguyen, H. T., Tian, G., and Murph, M. M. (2014). Molecular epigenetics in the management of ovarian cancer: are we investigating a rational clinical promise?. *Frontiers in oncology*, 4, 71. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00071>
 33. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-463. <https://doi.org/10.1038/nature02625>
 34. Gillette, T. G., and Hill, J. A. (2015). Readers, writers, and erasers: chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation research*, 116(7), 1245–1253. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303630>
 35. Sawan, C., and Herceg, Z. (2010). Histone Modifications and Cancer. *Advances in Genetics* 70, 57-85). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60003-4>
 36. Mottamal, M., Zheng, S., Huang, T. L., and Wang, G. (2015). Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer

- agents. *Molecules*, 20(3), 3898-3941. <https://doi.org/10.3390/molecules20033898>
37. Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, 116(2), 259-272. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00044-3)
 38. Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
 39. Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
 40. Cui, D., and Xu, X. (2018). DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1315. <https://doi.org/10.3390/ijms19051315>
 41. Bosutti, A., Zanconati, F., Grassi, G., Dapas, B., Passamonti, S., and Scaggiante, B. (2016). Epigenetic and miRNAs Dysregulation in Prostate Cancer: The role of Nutraceuticals. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 16(11), 1385-1402. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160425105257>
 42. Zhang, J., Yang, C., Wu, C., Cui, W., and Wang, L. (2020). DNA Methyltransferases in Cancer: Biology, Paradox, Aberrations, and Targeted Therapy. *Cancers*, 12(8), 2123. <https://doi.org/10.3390/cancers12082123>
 43. Wang, S., Wu, W., and Claret, F. X. (2017). Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers. *Epigenetics*, 12(3), 187-197. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1273308>
 44. Sharma, S., Kelly, T. K., and Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
 45. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
 46. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
 47. Carter, J. V., O'Brien, S. J., Burton, J. F., Oxford, B. G., Stephen, V., Hallion, J., Bishop, C., Galbraith, N. J., Eichenberger, M. R., Sarojini, H., Hattab, E., and Galandiuk, S. (2019). The microRNA-200 family acts as an oncogene in colorectal cancer by inhibiting the tumor suppressor RASSF2. *Oncology letters*, 18(4), 3994–4007. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10753>

48. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9(402). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
49. Macfarlane, L.A., and Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current genomics*, 11(7), 537-561. <https://doi.org/10.2174/138920210793175895>
50. Hitit, M., Kurar, E., ve Guzeloglu, A. (2015). MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10, 3. <https://doi.org/10.17094/avbd.35776>
51. Bi, C. W., Zhang, G. Y., Bai, Y., Zhao, B., and Yang, H. (2019). Increased expression of miR-153 predicts poor prognosis for patients with prostate cancer. *Medicine*, 98(36), 16705. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000016705>
52. Ramassone, A., Pagotto, S., Veronese, A., and Visone, R. (2018). Epigenetics and MicroRNAs in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 459. <https://doi.org/10.3390/ijms19020459>
53. Lai, X., Eberhardt, M., Schmitz, U., and Vera, J. (2019). Systems biology-based investigation of cooperating microRNAs as monotherapy or adjuvant therapy in cancer. *Nucleic acids research*, 47(15), 7753-7766. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz638>
54. Shivakumar, M., Lee, Y., Bang, L., Garg, T., Sohn, K. A., and Kim, D. (2017). Identification of epigenetic interactions between miRNA and DNA methylation associated with gene expression as potential prognostic markers in bladder cancer. *BMC medical genomics*, 10(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12920-017-0269-y>
55. Memari, F., Joneidi, Z., Taheri, B., Aval, S. F., Roointan, A., and Zarghami, N. (2018). Epigenetics and Epi-miRNAs: Potential markers/therapeutics in leukemia. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 106, 1668-1677. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.133>
56. Arif, K., Elliott, E., Haupt, L., and Griffiths, L. (2020). Regulatory Mechanisms of Epigenetic miRNA Relationships in Human Cancer and Potential as Therapeutic Targets. *Cancers*, 12(10), 2922. <https://doi.org/10.3390/cancers12102922>
57. Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C. D., Chan, K. K., Marcucci, G., Calin, G. A., Huebner, K., and Croce, C. M. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15805–15810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707628104>
58. Tew, K. D., Fisher, P. B., & Croce, C. (2017). miRNA and Cancer. *Elsevier Science*, 135(1), 230

59. Reale, E., Taverna, D., Cantini, L., Martignetti, L., Osella, M., De Pitta, C., Virga F., Orso F., and Caselle, M. (2019). Investigating the epi-miRNome: identification of epi-miRNAs using transfection experiments. *Epigenomics*, 11(14), 1581-1599. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0050>
60. Gurbuz, V., Kiliccioglu, I., Dikmen, A. U., Bilen, C. Y., Sozen, S., and Konac, E. (2020). Comparative analysis of epi-miRNA expression levels in local/locally advanced and metastatic prostate cancer patients. *Gene*, 758, 144963. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144963>
61. Varol, N., Konac, E., Gurocak, O. S., and Sozen, S. (2011). The realm of microRNAs in cancers. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 1079-1089. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0205-0>
62. Iorio, M. V., Piovan, C., and Croce, C. M. (2010). Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: An intricate network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10), 694-701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2010.05.005>
63. Kim, J. S., Kim, E. J., Lee, S., Tan, X., Liu, X., Park, S., Kang, K., Yoon, J. S., Ko, Y. H., Kurie, J. M., and Ahn, Y. H. (2019). MiR-34a and miR-34b/c have distinct effects on the suppression of lung adenocarcinomas. *Experimental molecular medicine*, 51(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0203-1>
64. Imani, S., Wu, R.C., and Fu, J. (2018). MicroRNA-34 family in breast cancer: from research to therapeutic potential. *Journal of Cancer*, 9(20), 3765-3775. <https://doi.org/10.7150/jca.25576>
65. Zhang, L., Liao, Y., and Tang, L. (2019). MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research*, 38(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1059-5>
66. Liu, X., Luo, X., Wu, Y., Xia, D., Chen, W., Fang, Z., Deng, J., Hao, Y., Yang, X., Zhang, T., Zhou, L., Wu, Y., Wang, Q., Xu, J., Hu, X., and Li, L. (2018). MicroRNA-34a Attenuates Paclitaxel Resistance in Prostate Cancer Cells via Direct Suppression of JAG1/Notch1 Axis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(1), 261-276. <https://doi.org/10.1159/000494004>
67. Ma, Y., Fan, B., Ren, Z., Liu, B., and Wang, Y. (2019). Long noncoding RNA DANCR contributes to docetaxel resistance in prostate cancer through targeting the miR-34a-5p/JAG1 pathway. *OncoTargets and therapy*, 12, 5485-5497. <https://doi.org/10.2147/OTT.S197009>
68. McDonald, A. C., Vira, M., Shen, J., Sanda, M., Raman, J. D., Liao, J., Patil, D., and Taioli, E. (2018). Circulating microRNAs in plasma as potential biomarkers for the early detection of prostate cancer. *The Prostate*, 78(6), 411-418. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pros.23485>
69. Hasakova, K., Reis, R., Vician, M., Zeman, M., and Herichova, I. (2019). Expression of miR-34a-5p is up-regulated in human colorectal cancer and

- correlates with survival and clock gene PER2 expression. *PLoS One*, 14(10), 0224396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224396>
70. Szczyrba, J., Löprich, E., Wach, S., Jung, V., Unteregger, G., Barth, S., Grobholz, R., Wieland, W., Stöhr, R., Hartmann, A., Wullich, B., and Grässer, F. (2010). The MicroRNA Profile of Prostate Carcinoma Obtained by Deep Sequencing. *Molecular Cancer Research*, 8(4), 529-538. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0443>
 71. Wang, C.Z., Deng, F., Li, H., Wang, D.D., Zhang, W., Ding, L., and Tang, J.H. (2018). MiR-101: a potential therapeutic target of cancers. *American journal of translational research*, 10(11), 3310-3321.
 72. Chakravarthi, B. V., Goswami, M. T., Pathi, S. S., Robinson, A. D., Cieşlik, M., Chandrashekar, D. S., Agarwal, S., Siddiqui, J., Daignault, S., Carskadon, S. L., Jing, X., Chinnaiyan, A. M., Kunju, L. P., Palanisamy, N., and Varambally, S. (2016). MicroRNA-101 regulated transcriptional modulator SUB1 plays a role in prostate cancer. *Oncogene*, 35(49), 6330-6340. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.164>
 73. Wach, S., Nolte, E., Szczyrba, J., Stöhr, R., Hartmann, A., Ørntoft, T., Dyrskjöt, L., Eltze, E., Wieland, W., Keck, B., Ekici, A. B., Grässer, F., and Wullich, B. (2012). MicroRNA profiles of prostate carcinoma detected by multiplatform microRNA screening. *International Journal of Cancer*, 130(3), 611-621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.26064>
 74. Hua, Y., Liang, C., Miao, C., Wang, S., Su, S., Shao, P., Liu, B., Bao, M., Zhu, J., Xu, A., Zhang, J., Li, J., and Wang, Z. (2018). MicroRNA-126 inhibits proliferation and metastasis in prostate cancer via regulation of ADAM9. *Oncology letters*, 15(6), 9051–9060. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8528>
 75. Al-Kafaji, G., Said, H. M., Alam, M. A., and Al Naieb, Z. T. (2018). Blood-based microRNAs as diagnostic biomarkers to discriminate localized prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and allow cancer-risk stratification. *Oncology letters*, 16(1), 1357-1365. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8778>
 76. Watahiki, A., Macfarlane, R. J., Gleave, M. E., Crea, F., Wang, Y., Helgason, C. D., and Chi, K. N. (2013). Plasma miRNAs as Biomarkers to Identify Patients with Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7757-7770.
 77. Otsubo, T., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Shimada, S., Goto, K., and Yuasa, Y. (2011). MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis. *PLoS One*, 6(1), 16617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016617>
 78. Yang, Z., Wang, R., Zhang, T., and Dong, X. (2015). MicroRNA-126 regulates migration and invasion of gastric cancer by targeting CADM1.

79. Hu, M., Xiong, S., Chen, Q., Zhu, S., and Zhou, X. (2019). Novel role of microRNA-126 in digestive system cancers: From bench to bedside. *Oncology Letters*, 17(1), 31-41. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9639>
80. Verma, S., Pandey, M., Shukla, G. C., Singh, V., and Gupta, S. (2019). Integrated analysis of miRNA landscape and cellular networking pathways in stage-specific prostate cancer. *PLoS One*, 14(11), e0224071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224071>
81. Liu, Y., Li, F., Lai, D., Xie, Q., Yin, Y., Yang, M., and Su, Z. (2019). MicroRNA-140 inhibits proliferation and promotes apoptosis and cell cycle arrest of prostate cancer via degrading SOX4. *Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, 24(1), 249-255.
82. Li, Y., Deng, X., Zeng, X., and Peng, X. (2016). The Role of Mir-148a in Cancer. *Journal of Cancer*, 7(10), 1233-1241. <https://doi.org/10.7150/jca.14616>
83. Hart, M., Nolte, E., Wach, S., Szczyrba, J., Taubert, H., Rau, T. T., Hartmann A., Grässer FA., and Wullich, B. (2014). Comparative microRNA Profiling of Prostate Carcinomas with Increasing Tumor Stage by Deep Sequencing. *Molecular Cancer Research*, 12(2), 250-263. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0230>
84. Zhu, Y., Gu, L., Li, Y., Lin, X., Shen, H., Cui, K., Chen, L., Zhou, F., Zhao, Q., Zhang, J., Zhong, B., Prochownik, E., and Li, Y. (2017). miR-148a inhibits colitis and colitis-associated tumorigenesis in mice. *Cell Death Differentiation*, 24(12), 2199-2209. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.151>
85. Dybos, S. A., Flatberg, A., Halgunset, J., Viset, T., Rolfseng, T., Kvam, S., and Skogseth, H. (2018). Increased levels of serum miR-148a-3p are associated with prostate cancer. *acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 126(9), 722-731. <https://doi.org/10.1111/apm.12880>
86. Murata, T., Takayama, K., Katayama, S., Urano, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Takahashi, S., Kawazu, C., Hasegawa, A., Ouchi, Y., Homma, Y., Hayashizaki, Y., and Inoue, S. (2010). miR-148a is an androgen-responsive microRNA that promotes LNCaP prostate cell growth by repressing its target CAND1 expression. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 13(4), 356–361. <https://doi.org/10.1038/pcan.2010.32>
87. Liu, X., Li, J., Qin, F., and Dai, S. (2016). miR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncology Letters*, 11(6), 3911-3916. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4509>
88. Zhu, C., Li, J., Ding, Q., Cheng, G., Zhou, H., Tao, L., Cai, H., Li, P., Cao, Q., Ju, X., Meng, X., Qin, C., Hua, L., Shao, P., and Yin, C. (2013). miR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGF α in prostate

- cancer cell lines. *The Prostate*, 73(10), 1082–1089. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pros.22656>
89. Li, S., Ma, Y., Hou, X., Liu, Y., Li, K., Xu, S., and Wang, J. (2015). MiR-185 acts as a tumor suppressor by targeting AKT1 in non-small cell lung cancer cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(9), 11854-11862.
 90. Dong-xu, W., Jia, L., and Su-juan, Z. (2015). MicroRNA-185 is a novel tumor suppressor by negatively modulating the Wnt/β-catenin pathway in human colorectal cancer [Original Article]. *Indian Journal of Cancer*, 52(7), 182-185. <https://doi.org/10.4103/0019-509x.186576>
 91. Imam, J. S., Buddavarapu, K., Lee-Chang, J. S., Ganapathy, S., Camosy, C., Chen, Y., and Rao, M. K. (2010). MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*, 29(35), 4971-4979. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.233>
 92. Ostadrahimi, S., Abedi Valugardi, M., Hassan, M., Haddad, G., Fayaz, S., Parvizhamidi, M., Mahdian, R., and Fard Esfahani, P. (2018). miR-1266-5p and miR-185-5p Promote Cell Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 19(8), 2305-2311. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.8.2305>
 93. Tian, C., Deng, Y., Jin, Y., Shi, S., and Bi, H. (2018). Long non-coding RNA RNCR3 promotes prostate cancer progression through targeting miR-185-5p. *American journal of translational research*, 10(5), 1562-1570.
 94. Kristensen, H., Thomsen, A. R., Haldrup, C., Dyrskjøl, L., Høyer, S., Borre, M., Mouritzen, P., Ørntoft, T. F., and Sørensen, K. D. (2016). Novel diagnostic and prognostic classifiers for prostate cancer identified by genome-wide microRNA profiling. *Oncotarget*, 7(21), 30760-30771. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8953>
 95. Chen, Y., & Chen, Y. (2017). Members of the microRNA-200 family are promising therapeutic targets in cancer (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, 10-17. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4488>
 96. Guan, H., You, Z., Wang, C., Fang, F., Peng, R., Mao, L., Xu, B., & Chen, M. (2019). MicroRNA-200a suppresses prostate cancer progression through BRD4/AR signaling pathway. *Cancer medicine*, 8(4), 1474–1485. <https://doi.org/10.1002/cam4.2029>
 97. Williams, L. V., Veliceasa, D., Vinokour, E., & Volpert, O. V. (2013). miR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis. *PloS one*, 8(12), e83991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083991>
 98. Osella, M., Riba, A., Testori, A., Corà, D., and Caselle, M. (2014). Interplay of microRNA and epigenetic regulation in the human regulatory network. *Frontiers in genetics*, 5, 345. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00345>

99. Nakagawa, T., Kanai, Y. A. E., Saito, Y., Kitamura, T., Kakizoe, T., and Hirohashi, S. (2003). Increased DNA Methyltransferase 1 Protein Expression in Human Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *The Journal of Urology*, 170(6,1), 2463-2466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1097/01.ju.0000095919.50869.c9>
100. Etoh, T., Kanai, Y., Ushijima, S., Nakagawa, T., Nakanishi, Y., Sasako, M., Kitano, S., and Hirohashi, S. (2004). Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *The American journal of pathology*, 164(2), 689–699. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63156-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63156-2)
101. Nakagawa, T., Kanai, Y., Ushijima, S., Kitamura, T., Kakizoe, T., and Hirohashi, S. (2005). DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *Journal of Urology*, 173(5), 1767-1771. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000154632.11824.4d>
102. Patra, S. K., Patra, A., Zhao, H., and Dahiya, R. (2002). DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 33(3), 163-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mc.10033>
103. Zhang, W., and Xu, J. (2017). DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomarker Research*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0081-z>
104. Calcagno, D. Q., Gigeck, C. O., Chen, E. S., Burbano, R. R., and Smith, M. (2013). DNA and histone methylation in gastric carcinogenesis. *World journal of gastroenterology*, 119(8), 1182-1192. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i8.1182>
105. Kanai, Y., Ushijima, S., Nakanishi, Y., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. (2003). Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer Letters*, 192(1), 75-82. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00689-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00689-4)
106. Qi, D., Li, J., Que, B., Su, J., Li, M., Zhang, C., Yang, M., Zhou, G., and Ji, W. (2016). Long non-coding RNA DBCCR1-003 regulate the expression of DBCCR1 via DNMT1 in bladder cancer. *Cancer Cell International*, 16(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0356-8>
107. Roscigno, G., Quintavalle, C., Donnarumma, E., Puoti, I., Diaz-Lagares, A., Iaboni, M., Fiore, D., Russo, V., Todaro, M., Romano, G., Thomas, R., Cortino, G., Gaggianesi, M., Esteller, M., Croce, C. M., and Condorelli, G. (2016). MiR-221 promotes stemness of breast cancer cells by targeting DNMT3b. *Oncotarget*, 7(1), 580-592. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5979>

108. Pang, Y., Liu, J., Li, X., Xiao, G., Wang, H., Yang, G., Li, Y., Tang, S. C., Qin, S., Du, N., Zhang, H., Liu, D., Sun, X., and Ren, H. (2018). MYC and DNMT3A-mediated DNA methylation represses microRNA-200b in triple negative breast cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(12), 6262-6274. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13916>
109. Ma, H. S., Wang, E. L., Xu, W. F., Yamada, S., Yoshimoto, K., Qian, Z. R., Shi, L., Liu, L. L., and Li, X. H. (2018). Overexpression of DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1 (DNMT1) And DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A (DNMT3A) Is Associated with Aggressive Behavior and Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Human Pituitary Adenomas. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 4841-4850. <https://doi.org/10.12659/msm.910608>
110. Li, M., Wang, Y., Song, Y., Bu, R., Yin, B., Fei, X., Guo Q., and Wu, B. (2014). Aberrant DNA methyltransferase 1 expression in clear cell renal cell carcinoma development and progression. *Chinese journal of cancer research*, 26(4), 371-381. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.08.03>
111. Graça, I., Sousa, E. J., Costa-Pinheiro, P., Vieira, F. Q., Torres-Ferreira, J., Martins, M. G., Henrique, R., and Jerónimo, C. (2014). Anti-neoplastic properties of hydralazine in prostate cancer. *Oncotarget*, 5(15), 5950–5964. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1909>
112. Jagadeesh, S., Sinha, S., Pal, B. C., Bhattacharya, S., and Banerjee, P. P. (2007). Mahanine reverses an epigenetically silenced tumor suppressor gene RASSF1A in human prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(1), 212-217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.005>
113. Agarwal, S., Amin, K. S., Jagadeesh, S., Baishay, G., Rao, P. G., Barua, N. C., Bhattacharya, S., and Banerjee, P. P. (2013). Mahanine restores RASSF1A expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells. *Molecular cancer*, 12(1), 99. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-99>
114. Bowen, C., Ostrowski, M. C., Leone, G., and Gelmann, E. P. (2019). Loss of PTEN Accelerates NKX3.1 Degradation to Promote Prostate Cancer Progression. *Cancer research*, 79(16), 4124–4134. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-18-4110>
115. Le Magnen, C., Virk, R. K., Dutta, A., Kim, J. Y., Panja, S., Lopez-Bujanda, Z. A., Califano, A., Drake, C. G., Mitrofanova, A., and Abate-Shen, C. (2018). Cooperation of loss of NKX3.1 and inflammation in prostate cancer initiation. *Disease models mechanisms*, 11(11), 035139. <https://doi.org/10.1242/dmm.035139>
116. Majid, S., Dar, A. A., Saini, S., Shahryari, V., Arora, S., Zaman, M. S., Chang, I., Yamamura, S., Tanaka, Y., Chiyomaru, T., Deng, G., and Dahiya, W. (2018). Overexpression of DNMT1 and DNMT3A is associated with aggressive behavior and hypermethylation of tumor suppressor genes in human prostate adenomas. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 4841-4850. <https://doi.org/10.12659/msm.910608>

- R. (2013). miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(1), 73–84. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2952>
117. Shiina, M., Hashimoto, Y., Kato, T., Yamamura, S., Tanaka, Y., Majid, S., Saini, S., Varahram, S., Kulkarni, P., Dasgupta, P., Mitsui, Y., Sumida, M., Tabatabai, L., Deng, G., Kumar, D., and Dahiya, R. (2017). Differential expression of miR-34b and androgen receptor pathway regulate prostate cancer aggressiveness between African-Americans and Caucasians. *Oncotarget*, 8(5), 8356-8368. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14198>
 118. Chamani, F., Sadeghizadeh, M., Masoumi, M., and Babashah, S. (2016). Evaluation of MiR-34 Family and DNA Methyltransferases 1, 3A, 3B Gene Expression Levels in Hepatocellular Carcinoma Following Treatment with Dendrosomal Nanocurcumin. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 17(S3), 219–224. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.219>
 119. Sengupta, D., Deb, M., and Patra, S. K. (2018). Antagonistic activities of miR-148a and DNMT1: Ectopic expression of miR-148a impairs DNMT1 mRNA and dwindle cell proliferation and survival. *Gene*, 660, 68-79. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.075>
 120. Duursma, A. M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., and Agami, R. (2008). miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *Rna*, 14(5), 872-877. <https://doi.org/10.1261/rna.972008>
 121. Braconi, C., Huang, N., and Patel, T. (2010). MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology*, 51(3), 881-890. <https://doi.org/10.1002/hep.23381>
 122. Hamilton, M. P., Rajapakshe, K. I., Bader, D. A., Cerne, J. Z., Smith, E. A., Coarfa, C., Hartig, S. M., and McGuire, S. E. (2016). The Landscape of microRNA Targeting in Prostate Cancer Defined by AGO-PAR-CLIP. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 18(6), 356-370. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.04.008>
 123. Hua, D., Mo, F., Ding, D., Li, L., Han, X., Zhao, N., Foltz, G., Lin, B., Lan, Q., and Huang, Q. (2012). A catalogue of glioblastoma and brain MicroRNAs identified by deep sequencing. *Omics : a journal of integrative biology*, 16(12), 690–699. <https://doi.org/10.1089/omi.2012.0069>
 124. Ma, W., Zhang, X., Chai, J., Chen, P., Ren, P., and Gong, M. (2014). Circulating miR-148a is a significant diagnostic and prognostic biomarker for patients with osteosarcoma. *Tumour Biology*, 35(12), 12467-12472. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2565-x>

125. Zhang, H., Wang, Y., Xu, T., Li, C., Wu, J., He, Q., Wang, G., Ding, C., Liu, K., Tang, H., and Ji, F. (2016). Increased expression of microRNA-148a in osteosarcoma promotes cancer cell growth by targeting PTEN. *Oncology letters*, 12(5), 3208–3214. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5050>
126. Yuan, K., Lian, Z., Sun, B., Clayton, M. M., Ng, I. O., and Feitelson, M. A. (2012). Role of miR-148a in hepatitis B associated hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 7(4), e35331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035331>
127. Theodore, S. C., Davis, M., Zhao, F., Wang, H., Chen, D., Rhim, J., Dean-Colomb, W., Turner, T., Ji, W., Zeng, G., Grizzle, W., and Yates, C. (2014). MicroRNA profiling of novel African American and Caucasian Prostate Cancer cell lines reveals a reciprocal regulatory relationship of miR-152 and DNA methyltransferase 1. *Oncotarget*, 5(11), 3512–3525. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1953>.
128. Ramalho-Carvalho, J., Gonçalves, C. S., Graça, I., Bidarra, D., Pereira-Silva, E., Salta, S., Maria G., Antonio G., Manel E., Bruno C., Rui H., and Jerónimo, C. (2018). A multiplatform approach identifies miR-152-3p as a common epigenetically regulated onco-suppressor in prostate cancer targeting TMEM97. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0475-2>
129. Chen, H., Liu, H., Zou, H., Chen, R., Dou, Y., Sheng, S., Dai, S., Ai, J., Melson, J., Kittles, R. A., Pirooznia, M., Liptay, M. J., Borgia, J. A., and Deng, Y. (2016). Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers. *Journal of Cancer*, 7(5), 490-499. <https://doi.org/10.7150/jca.12351>
130. Moya, L., Meijer, J., Schubert, S., Martin, F., and Batra, J. (2019). Assessment of miR-98-5p, miR-152-3p, miR-326 and miR-4289 Expression as Biomarker for Prostate Cancer Diagnosis. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1154. <https://doi.org/10.3390/ijms20051154>
131. Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*, 5(7), 11803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011803>
132. Jiang, X., Du, L., Duan, W., Wang, R., Yan, K., Wang, L., Li, J., Zheng, G., Zhang, X., Yang, Y., and Wang, C. (2016). Serum microRNA expression signatures as novel noninvasive biomarkers for prediction and prognosis of muscle-invasive bladder cancer. *Oncotarget*, 7(24), 36733-36742. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9166>
133. Dudzic, E., Miah, S., Choudhry, H. M., Owen, H. C., Blizard, S., Glover, M., Hamdy, F. C., and Catto, J. W. (2011). Hypermethylation of CpG islands and shores around specific microRNAs and mirtrons is associated with the

- phenotype and presence of bladder cancer. *Clin Cancer Research*, 17(6), 1287-1296. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-10-2017>
134. Kim, J., Yao, F., Xiao, Z., Sun, Y., and Ma, L. (2018). MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer Metastasis Reviews*, 37(1), 5-15. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9712-y>
 135. Pan, J., Ding, M., Xu, K., Yang, C., and Mao, L.J. (2017). Exosomes in diagnosis and therapy of prostate cancer. *Oncotarget*, 8(57), 97693-97700. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18532>
 136. Turchinovich, A., Samatov, T. R., Tonevitsky, A. G., and Burwinkel, B. (2013). Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Frontiers in Genetics*, 4, 119. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00119>
 137. Huang, S., Li, X., and Zhu, H. (2016). MicroRNA-152 Targets Phosphatase and Tensin Homolog to Inhibit Apoptosis and Promote Cell Migration of Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 22, 4330-4337. <https://doi.org/10.12659/msm.898110>
 138. Pang, Y., Young, C. Y., and Yuan, H. (2010). MicroRNAs and prostate cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 42(6), 363-369. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq038>
 139. Guo, F., Parker Kerrigan, B. C., Yang, D., Hu, L., Shmulevich, I., Sood, A. K., Xue, F., and Zhang, W. (2014). Post-transcriptional regulatory network of epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions. *Journal of hematology & oncology*, 7, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-19>
 140. Wu, Q., Lu, R.L., Li, J.X., and Rong, L.J. (2017). MiR-200a and miR-200b target PTEN to regulate the endometrial cancer cell growth in vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(5), 498-502. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.05.007>
 141. oneyama, K., Ishibashi, O., Kawase, R., Kurose, K., and Takeshita, T. (2015). miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma. *Anticancer research*, 35(3), 1401–1410.
 142. Suo, H. B., Zhang, K. C., and Zhao, J. (2018). MiR-200a promotes cell invasion and migration of ovarian carcinoma by targeting PTEN . *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(13), 4080-4089. https://doi.org/10.26355/eurrev_201807_15398
 143. Ning, X., Shi, Z., Liu, X., Zhang, A., Han, L., Jiang, K., Kang, C., and Zhang, Q. (2015). DNMT1 and EZH2 mediated methylation silences the microRNA-200b/a/429 gene and promotes tumor progression. *Cancer letters*, 359(2), 198-205. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.01.005>

144. Liu, J., Zhang, X., Huang, Y., Zhang, Q., Zhou, J., Zhang, X., and Wang, X. (2019). miR-200b and miR-200c co-contribute to the cisplatin sensitivity of ovarian cancer cells by targeting DNA methyltransferases. *Oncology Letters*, 17(2), 1453-1460. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9745>
145. Zeng, X., Qu, X., Zhao, C., Xu, L., Hou, K., Liu, Y., Zhang, N., Feng, J., Shi, S., Zhang, L., Xiao, J., Guo, Z., Teng, Y., and Che, X. (2019). FEN1 mediates miR-200a methylation and promotes breast cancer cell growth via MET and EGFR signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(10), 10717–10730. <https://doi.org/10.1096/fj.201900273R>







EK-1. Etik Kurul

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU									
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI		Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu						
	AÇIK ADRES		Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara						
	TELEFON								
	FAKS								
	E-POSTA								
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Prostat kanserli olgularda miRNA ifadenin düzeylerinin karşılaştırmalı analizi						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		Prof. Dr. Ece KONAÇ						
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI/UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ		Tıbbi Biyoloji AD. / G.Ü.T.F.						
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)								
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ		Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar- Tanımlamaya yönelik olarak genetik materyalde yapılacak araştırmalar (Gen tedavisi/ klinik araştırmaları ve farmogenetik çalışmalar dışında kalarak)-Doktora tezi						
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER		TEK MERKEZ ☒	COK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı		Tarihi	Ver.No	Dili				
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		21.09.2018	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐		
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU		21.09.2018	1	Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ			☒					
	BİYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU			☐					
	DİĞER			☐					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 686		Toplantı tarihi: 24.09.2018						
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi TÜBİTAK tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, TÜBİTAK kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.								
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Canan ULUOĞLU							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza	
Prof. Dr. Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	E ☒ H ☐			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı Uyuğu : GÜRBÜZ, Venhar
Doğum tarihi ve yeri : T.C.

Eğitim Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	Devam ediyor
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	2011
Lisans	Selçuk Üniversitesi / Biyoloji Bölümü	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2006-Devam ediyor	Hacettepe Üniversitesi	Uzman

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler:

Dans etmek, kitap okumak, tiyatroya gitmek ve yüzmek

YAYINLAR

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Gurbuz, V., Konac, E., Varol, N., Yilmaz, A., Gurocak, S., Menevse, S., & Sozen, S. (2014). Effects of AG490 and S3I-201 on regulation of the JAK/STAT3 signaling pathway in relation to angiogenesis in TRAIL-resistant prostate cancer cells in vitro. *Oncology letters*, 7(3), 755–763. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.1795>

2. Gurbuz, V., Kiliccioglu, I., Dikmen, A. U., Bilen, C. Y., Sozen, S., & Konac, E. (2020). Comparative analysis of epi-miRNA expression levels in local/locally advanced and metastatic prostate cancer patients. *Gene*, 758, 144963. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144963>
3. Ceyhan, M., Celik, M., Demir, E. T., Gurbuz, V., Aycan, A. E., & Unal, S. (2013). Acquisition of meningococcal serogroup W-135 carriage in Turkish Hajj pilgrims who had received the quadrivalent meningococcal polysaccharide vaccine. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20(1), 66–68. <https://doi.org/10.1128/CVI.00314-12>
4. Demir, E. T., Ceyhan, M., Simsek, M., Gunduz, T., Arlier, S., Aytac, R., Aycan, A. E., & Gurbuz, V. (2012). The prevalence of different HPV types in Turkish women with a normal Pap smear. *Journal of medical virology*, 84(8), 1242–1247. <https://doi.org/10.1002/jmv.23333>
5. Ceyhan, M., Yildirim, I., Tekeli, A., Yurdakok, M., Us, E., Altun, B., Kutluk, T., Cengiz, A. B., Gurbuz, V., Barin, C., Bagdat, A., Cetinkaya, D., Gur, D., & Tuncel, O. (2008). A *Chryseobacterium meningosepticum* outbreak observed in 3 clusters involving both neonatal and non-neonatal pediatric patients. *American journal of infection control*, 36(6), 453–457. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2007.09.008>
6. Gurbuz V, Yilmaz A, Gokce O, Konac E. (2011). The Apoptotic Effects of Cisplatin on Human Colon Cancer Cell Line (HT29). *Marmara Medical Journal*; 24 (2):100-105 DOI: 10.5472/MMJ.2011.01784.1
7. Gokce O, Yilmaz A, Gurbuz V, Konac E, Ekmekci A. (2011). APOPTOTIC EFFECT OF VINORELBINE ON HUMAN SERVICAL CANCER HeLa CELLS. *DEÜ journal of Medicine*; 25, (1):05–14
8. Ceyhan, M., Ozsurekci, Y., Gürler, N., Ozkan, S., Sensoy, G., Belet, N., Hacimustafaoglu, M., Celebi, S., Keser, M., Dinleyici, E. C., Alhan, E., Baki, A., Oner, A. F., Uzun, H., Kurugol, Z., Aycan, A. E., Gurbuz, V., Karadag Oncel, E., Celik, M., & Ozkaya Parlakay, A. (2013). Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes that cause parapneumonic empyema in Turkey. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20(7), 972–976. <https://doi.org/10.1128/CVI.00765-12>
9. Özkaya-Parlakay, A., Cengiz, A. B., Ceyhan, M., Bağdat, A., Barın-Kurtoğlu, Ç., Gürbüz, V., Aycan, A. E., & Kara, A. (2014). Vancomycin-resistant enterococcus colonization and infection in children: six-year follow-up. *The Turkish journal of pediatrics*, 56(6), 618–625.
10. Ceyhan, M., Ozsurekci, Y., Aydin, M. M., Akcali, K. C., Talim, B., Celik, M., Karadag Oncel, E., Gurbuz, V., Aycan, A. E., Onbasilar, I., & Buzgan, T. (2015). Determination of the presence of diphtheria toxin in the myocardial tissue of rabbits and a female subject by using an immunofluorescent antibody method. *Journal of clinical medicine research*, 7(6), 472–478. <https://doi.org/10.14740/jocmr2142w>
11. Ceyhan, M., Gürler, N., Ozsurekci, Y., Keser, M., Aycan, A. E., Gurbuz, V., Salman, N., Camcioglu, Y., Dinleyici, E. C., Ozkan, S., Sensoy, G., Belet, N., Alhan, E., Hacimustafaoglu, M., Celebi, S., Uzun, H., Faik Oner, A., Kurugol, Z., Ali Tas, M., Aygun, D., Coşkun, Y. (2014). Meningitis caused by *Neisseria Meningitidis*, *Hemophilus Influenzae* Type B and *Streptococcus Pneumoniae* during 2005-2012

in Turkey. A multicenter prospective surveillance study. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(9), 2706–2712. <https://doi.org/10.4161/hv.29678>

12. Uslu, Z.D.T. Ceyhan, M., Dinleyici, E., Kurugol, Z., Alpman, B.N., Karadag-Oncel, E., Gurbuz, V., Aycan, E., Tezer, H., Gulhan, B. (2013). Detection of the presence of *Bordetella pertussis* by real-time polymerase chain reaction in children diagnosed with pertussis and among their household contacts. *Journal of Vaccines and Vaccination*, 4:6

13. Ceyhan, M. et al. (2014). Bacterial Etiology and Pneumococcal Serotypes in Turkish Children with Acute Otitis Media. *Journal of Vaccines & Vaccination*. 05. 10.4172/2157-7560.1000214.

14. Ozsurekci, Y., Oktay Arıkan, K., Bayhan, C., Karadağ-Öncel, E., Emre Aycan, A., Gürbüz, V., Haşcelik, G., & Ceyhan, M. (2016). Can procalcitonin be a diagnostic marker for catheter-related blood stream infection in children?. *Jornal de pediatria*, 92(4), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2015.11.004>

15. Büyükcım, A., Güdücüoğlu, H., Karaman, K., Gürbüz, V., Aliyev, E., Kara, A., & Ceyhan, M. (2017). Invasive pneumococcal infection due to serotype 15A after the pneumococcal conjugate vaccine implementation in Turkey. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(8), 1892–1894. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1331802>

16. Tekin, R. T., Dinleyici, E. C., Ceyhan, M., Karbuz, A., Salman, N., Sutçu, M., Kurugol, Z., Balliel, Y., Celik, M., Hacimustafaoglu, M., Kuyucu, N., Kondolot, M., Sensoy, G., Metin, O., Kara, S. S., Dinleyici, M., Kılıç, O., Bayhan, C., Gurbuz, V., Aycan, E., ... Celebi, S. (2017). The prevalence, serogroup distribution and risk factors of meningococcal carriage in adolescents and young adults in Turkey. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(5), 1182–1189. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1268304>

17. Karadag Oncel, E., Ceyhan, M., Tanir Basaranoglu, S., Gurbuz, V., Aycan, A. E., Ozsurekci, Y., Kurugol, Z., Keser Emiroglu, M., Devrim, I., Karbuz, A., Altay Akisoglu, H. O., & Gurler, N. (2020). Surveillance of penicillin resistance of *Neisseria meningitidis* strains from invasive infections between 2013 and 2018 in Turkey. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 32(4), 213–216. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1721176>

18. Alkan, G., Emiroğlu, M., Dağı, H. T., Gürbüz, V., & Ceyhan, M. (2019). Necrotizing pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 despite PCV13. Neumonía necrosante causada por el serotipo 3 del *Streptococcus pneumoniae* a pesar de la inmunización con la VCN13. *Archivos argentinos de pediatria*, 117(2), e155–e157. <https://doi.org/10.5546/aap.2019.eng.e155>

ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Gurbuz V, Yılmaz A, Gokce O, Konac E. (2011). The Apoptotic Effects of Cisplatin on Human Colon Cancer Cell Line (HT29). Marmara Medical Journal; 24 (2):100-105 DOI: 10.5472/MMJ.2011.01784.1
2. Gokce O, Yılmaz A, Gurbuz V, Konac E, Ekmekci A. (2011). APOPTOTIC EFFECT OF VINORELBINE ON HUMAN SERVICAL CANCER HeLa CELLS. DEÜ journal of Medicine; 25, (1):05–14

BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTAPLARINDA BASILAN BİLDİRİLER:

1. Prostat Kanseri Olgularında miRNA İfade Düzeylerinin Karşılaştırmalı Analizi. Venhar Gürbüz, İlker Kılıçcıoğlu, Asiye Uğraş Dikmen, Cenk Y. Bilen, Sinan Sözen Ece Konaç 14. Üroonkoloji Kongresi 6-10 Kasım 2019 Regnum Karya Otel, Belek Antalya
2. Pneumococcal Serotypes Causing Invasive Pneumococcal Disease After PCV 7 Vaccination in Turkey. M. Ceyhan, M. Celik, A. Ozkaya Parlakay, Y. Ozsurekci, E. Karadag Oncel, E. Aycan, V. Gurbuz, Turkish Pneumococcus Study Group. The 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. P222. in Iguaçu Falls, Brazil from 11-15 March, 2012.
3. Türkiye'de PCV Aşılması Sonrasında İnvazif Pnömonokok Hastalığı'na Neden Olan Pnömonokok Serotipleri. M. Ceyhan, M. Celik, A. Ozkaya Parlakay, Y. Ozsurekci, E. Karadag Oncel, E. Aycan, V. Gurbuz, Türkiye Pnömonokok Çalışma Grubu. 1. pediatri uzmanlık akademisi derneği (puader) kongresi-S1. 23-27 Nisan 2012
4. Vinorelbine's effects on the cell cycle progression in HeLa cell line. Gokce O, Yılmaz A, Gurbuz V, Konac E, Ekmekci A. 9. International Society for the Study of Xenobiotics-P294. September 4-8 2010.
5. The Apoptotic Effects of Cisplatin on Human Colon Cancer Cell Line (HT29). Gurbuz V, Yılmaz A, Gokce O, Konac E. 9. International Society for the Study of Xenobiotics-P295 September 4-8 2010
6. Serotype distribution of Streptococcus pneumonia causing parapneumonic empyema in Turkey. M. Ceyhan, Y. Ozsurekci, E. Aycan, V. Gurbuz, Turkey Empyema Study Group. The 8th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases. P12. in Iguaçu Falls, Brazil from 11-15 March, 2012.
7. Escherichia Coli Suşlarında ESBL Pozitifliği ve Antibiyotik Hassasiyetlerinin Araştırılması. Gurbuz V, Albayrak T. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. P010. 3-7 Kasım 2012
8. Acinetobacter Baumannii İzolatlarında Antibiyotik Hassasiyetlerinin Araştırılması: Sürveyans Çalışması. Albayrak T, Gurbuz V. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. P011. 3-7 Kasım 2012

9. Meningitis Caused By Neisseria Meningitidis, Haemophilus Influenzae Type B And Streptococcus Pneumoniae During 2005–2012 In Turkey: Multicenter Prospective Study. Mehmet Ceyhan, Nezahat Gurler, Yasemin Ozsurekci, Melike Keser, Ahmet Emre Aycan, Venhar Gurbuz, Nuran Salman, Yildiz Camcioglu, Ener Cagri Dinleyici, Sengul Ozkan, Gulnar Sensoy, Nursen Belet, Emre Alhan, Mustafa Hacimustafaoglu, Solmaz Celebi, Hakan Uzun, Ahmet Faik Oner, Zafer Kurugol, Mehmet Ali Tas, Denizmen Aygun. Turkish Meningitis Surveillance Team. 31st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. Milan, Italy, May 28-June 1, 2013.

10. Çocuklarda Vankomisin Dirençli Enterokok Kolonizasyon ve Enfeksiyonları: 6 yıllık takip sonuçları. Aslınur Özkaya Parlakay, Ali Bülent Cengiz, Mehmet Ceyhan, Arzu Bağdat, Çağrı Barın Kurtoğlu, Venhar Gürbüz, Ahmet Emre Aycan, Ateş Kara. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya

11. Türk Çocuklarında Akut Otitis Media 'nın Bakteriyel Etiyolojisi ve Serotipleri Mehmet Ceyhan, Yasemin Ozsurekci, Nezahat Gürler, Eda Karadag Oncel, Melda Celik, Ahmet Emre Aycan, Venhar Gurbuz, Umut Akyol, Ozan Altuntaş, Adnan Karabent, Yıldız Camcioglu, Mehmet Ada, Emre Alhan, Özlem Özgür. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya

12. Whole Genome Genetic Analysis of F. Tularensis Positive Clinical Samples From Turkey. 53rd ICAAC 10-13 September, Denver, CO

13. Pneumococcal Serotypes Causing Childhood Invasive Pneumococcal Disease in Turkey 2011-2012.

14. Bacterial Etiology and Pneumococcal serotypes in Turkish Children with Acute Otitis Media. 9th International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Disease, Hyderabad, India, 9-13 March 2014

15. The Baseline Titers of Widal Agglutination Test For Healthy Individuals In Turkey. ESPID Dublin, Ireland, May 6-10, 2014

16. Prevalence of Nasopharyngeal Pneumococcal Carriage in Adolescents and Young Adults in Turkey. Mehmet Ceyhan, Venhar Gurbuz, Tuna Tekin, Adem Karbuç, Nuran Salman, Zafer Kurugöl, Yasemin Ballıel, Melda Celik, Meda Kondolot, Özge Metin, Cihangül Bayhan, Emre Aycan, Ener Dinleyici, Omer Kılıç, Gulnar Sensoy et al. 10th International Symposium on Pneumococci Diseases (ISPPD). 26-30 June, Glasgow, UK

SÖZLÜ BİLDİRİ:

1. Boğmacalı Çocuklarda ve Aile İçi Temaslılarında Bordetella Pertussis Varlığının Real-Time PCR ile Saptanması. Tamburacı Z, Ceyhan M, Dinleyici EC, Kurugöl Z, Alpman BN, Oncel E, Gurbuz V, Aycan E. 56. Türkiye Milli Pediatri Kongresi Amerikan Pediatri Akademisi Katılımı ile Uluslararası Pediatri Toplantısı 11. Milli Çocuk Hemşireliği Kongresi. 28 Kasım-2 Aralık 2012 Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Acapulco Otel- Girne

2. Boğmacalı Çocuklarda ve Aile İçi Temaslılarında Bordetella Pertussis Varlığının Real-Time PCR ile Saptanması. Tamburacı Z, Ceyhan M, Dinleyici EC, Kurugöl Z, Alpman BN, Oncel E, Gurbuz V, Aycan E. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya
3. Türkiye’de 2005-2011 Yılları Arasında *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tip B ve *Streptococcus pneumoniae*’nın Neden Olduğu Menenjitler: Çok Merkezli Prospektif Çalışma. Mehmet Ceyhan, Nezahat Gürler, Yasemin Ozsurekci, Melike Keser, Ahmet Emre Aycan, Venhar Gürbüz, Nuran Salman, Yıldız Camcıoğlu, Ener Çağrı Dinleyici, Şengül Özkan, Gülnar Şensoy, Nursen Belet, Emre Alhan, Mustafa Hacımustafaoğlu, Solmaz Celebi, Hakan Uzun, Ahmet Faik Öner, Zafer Kurugöl, Mehmet Ali Tas, Denizmen Aygün, Eda Karadağ Öncel, Melda Celik, *Türkiye Menenjit Surveyans Takımı*. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya
4. Türkiye’de Parapnömonik Ampiyem’e Neden Olan *Streptococcus pneumoniae*’nın Serotip Dağılımı. Mehmet Ceyhan, Yasemin Ozsurekci, Nezahat Gürler, Şengül Özkan, Gülnar Şensoy, Nursen Belet, Mustafa Hacımustafaoğlu, Solmaz Çelebi, Melike Keser, Ener Çağrı Dinleyici, Emre Alhan, Ali Baki, Ahmet Faik Öner, Hakan Uzun, Zafer Kurugöl, Ahmet Emre Aycan, Venhar Gürbüz, Eda Karadağ Öncel, Melda Çelik, Aslınur Özkaya Parlakay, *Türkiye Ampiyem Çalışma Grubu*. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya
5. Sağlıklı Türk Kadınlarında Servikal Smear Örneklerinde Farklı HPV Serotiplerinin Sıklığı. Esra Tamburacı Demir, Mehmet Ceyhan, Mehmet Şimşek, Tonguç Gündüz, Sefa Arlier, Ruşen Aytaç, Ahmet Emre Aycan, Venhar Gürbüz. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya
6. Türkiye’de Çocuklarda Görülen İnvazif Enfeksiyonlara Neden Olan *Streptococcus pneumoniae* İzolatlarının Serotipik ve Genotipik Dağılımı. Venhar Gürbüz, Ahmet Emre Aycan, Kumsal Çağlar, Mehmet Ceyhan. 8. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi.10-14 Mayıs 2013 Gloria Kongre Merkezi- Antalya
7. Türkiye’de PCV aşılması sonrasında invazif pnömokok hastalığının neden olan pnömokok serotipleri. 1. Pediatrik Uzmanlık Akademisi Kongresi. 3-27 Nisan 2012, Susesi Otel, Antalya
8. Türkiye’de Çocuklarda Görülen İnvazif Enfeksiyonlara Neden Olan *Streptococcus pneumoniae* İzolatlarının Serotip Dağılımı. 3. Pediatrik Uzmanlık Akademisi Kongresi. 30 Nisan-4 Mayıs 2014, Susesi Otel, Antalya
9. Santral Venöz Kateter İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonlarında Prokalsitoninin Yeri ve Prokalsitonin Ölçümünde RTA Prokalsitonin Kantifikasyon Cihazının Uyumu. 58. Türkiye Milli Pediatri Kongresi. 22-26 Ekim 2014 Kaya Palazzo, Belek, Antalya



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

