

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ  
DOKTORA TEZİ

SERVİKAL KANSERLERİN TANISINDA VE GELİŞİM SÜRECİNDE miRNA  
TABANLI BİYOBELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI

Ayşegül Yücel Polat

Danışman Öğretim Üyesi  
Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Mayıs

2021

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ayşegül Yücel Polat

## ÖZET

Doktora Tezi

Servikal Kanserlerin Tanısında ve Gelişim Sürecinde miRNA Tabanlı Biyobelirteçlerin  
Tanımlanması

Ayşegül Yücel Polat

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Servikal skuamöz hücreli karsinom (SCC) kadınlar arasında yaygın olarak görülen kanserlerdendir. Pap Smear ve HPV DNA testi SCC'nin öncül lezyonlarının belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemler olmasına rağmen tanı verme sırasında yaşanan zorlukların aşılması için spesifik ve sensitif moleküler biyobelirteçlerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. MikroRNA (miRNA)'lar hedef genlerinin ifadesini düzenleyerek birçok kanser tipinin oluşum ve gelişiminde rol oynayan kodlanmayan RNA molekülleridir. Birçok çalışma ile miRNA ve servikal kanser ilişkisi aydınlatılmaya çalışılsa da şimdiye kadar servikal lezyonların tanısında biyobelirteç olarak kullanılabilecek güçlü bir miRNA bulunamamıştır. Bu tez çalışmasının amacı; biyoinformatik yaklaşımlar ve deneysel analizler bir arada kullanılarak servikal kanser oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA ve hedeflerini ortaya çıkarmaktır. Çalışmanın ilk aşamasında, normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser gruplarını birbirinden ayırabilen miRNA'lar istatistiksel bir meta-analiz yöntemi ile mRNA'lar ile karşılaştırma analizleri ile ortaya çıkarılmıştır. Ardından gruplar arasında ifade değişikliği gösteren (DE) mRNA'lar miRNA hedefleri ile karşılaştırılmıştır. Bu analizler sonucunda öne çıkan miRNA ve hedef mRNA ifadelerinin gruplar arasındaki değişimi sitoloji ve doku örnekleri kullanılarak qRT-PCR ile araştırılmıştır. Bu deneyler sonucunda miR-25 ve hedefi olan KLF4 *in vitro* çalışmalar için aday biyobelirteçler olarak belirlenmiştir. Hem sitoloji ve hem de doku örneklerinde miR-25 ifadesinin prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanserde arttığı, KLF4 ifadesinin ise azaldığı bulunmuştur. HeLa hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* deneylerde ise miR-25 inhibisyonu sonrasında KLF4 ifadesinin arttığı, hücre proliferasyonu ve motilitesinin ise azaldığı saptanmıştır. Tüm bu bulgular sonucunda, miR-25 ve KLF4'ün servikal kanser oluşum ve gelişiminde önemli rolleri olan biyobelirteç adayları olduğu düşünülmektedir.

2021, 144 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Servikal kanser, SCC, meta-analiz, miRNA, mRNA, sitoloji, PAP Smear, FFPE, miR-25, KLF4

## ABSTRACT

PhD Thesis

Determination of miRNA based biomarkers in diagnosis and prognosis of cervical cancers

Ayşegül Yücel Polat

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Bala Gur Dedeoglu

Cervical squamous cell carcinoma (SCC) is one of the common cancer types among women. Although Pap smear test and HPV DNA testing are the main methods to detect precursor lesions of SCC in clinics, there is a need to reveal more specific and sensitive molecular biomarkers to provide more precise diagnosis. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play an important role in the formation and development of many cancer types by regulating expression of their targets. While many studies have investigated the relationship between miRNAs and cervical cancer, no robust miRNA biomarkers have been defined yet for diagnosis of cervical lesions. The aim of the study is to reveal the miRNAs and their targets, which have a role in the formation and development of cervical carcinoma. In this study, we performed a statistical meta-analysis to identify miRNAs and a class compassion analysis to evaluate mRNAs with the power to discriminate between normal, intraepithelial lesions and invasive cancer samples. Differentially expressed (DE) mRNAs were compared with the targets of meta-miRNAs. After bioinformatics analysis and qRT-PCR validations with cytology and tissue samples, we defined miR-25 and its target KLF4 (Kruppel-like factor 4) as candidate biomarkers for *in vitro* studies. Our results showed that miR-25 expression was significantly higher in precancerous lesions and invasive carcinoma while presenting consistent expression patterns in both cytological and FFPE tissue samples. In line with this, its direct target KLF4 expression decreased in precancerous lesions in cytological samples and also in the invasive cancer group in FFPE tissues. Furthermore, *in vitro* studies showed that mir-25 inhibition decreased proliferation and motility of HeLa cells and promoted an increase in the protein level of KLF4. We conclude that inhibition of miR-25 may upregulate KLF4 expression and regulate cell proliferation and motility in cervical cancer.

2021, 144 pages

**Keywords:** Cervical cancer, SCC, meta-analysis, miRNA, mRNA, cytology, PAP Smear, FFPE, miR-25, KLF4

## TEŞEKKÜR

Öncelikle; beni grubuna kabul ederek doktora eğitimim boyunca öğreneceğim birçok şey için bana yol açan, üstünde çalışmayı hayal ettiğim ve çok istediğim bu konu için bana çalışma fırsatı veren, beni doktora sürecim boyunca her şekilde destekleyen ve bir fikrin nereden nereye getirilebileceğini bana öğreten, bitmeyen pozitif enerjisiyle tıkanıp durduğum yerde devam edebilmemi sağlayan değerli akıl öğretmenim ve danışman hocam Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na,

Tüm çalışma sürecinde tez izleme komitesi üyeliği yapan, vakitlerini bana ayırarak yaptıkları bilimsel katkılarla tezimin şekillenmesine ve gelişmesine yardım eden, beni destekleyen sayın hocalarım Prof. Dr. Erkan Yılmaz ve Doç. Dr. Özlen Konu'ya, deneylerin bir kısmını tamamlayabilmemiz için laboratuvarını bize açarak verdiği destekler için değerli hocam Prof. Dr. Hakan Gürdal'a,

Çalışmanın patoloji kısmında verdiği destek, zaman ve tüm emekleri için değerli hocam Doç. Dr. Ebru Şebnem Ayva'ya, takıldığım her noktada verdiği çok değerli fikirlerle beni aydınlattığı için değerli hocam Prof. Dr. Özlem Özen'e ve tüm akademik eğitimim boyunca desteğini hep arkamda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Handan Özdemir'e,

Çalışmalarımın başından sonuna kadar bana bütün bildiklerini en ince ayrıntısına kadar anlatan, el veren, yanımda yürüyen canım arkadaşlarım Yasemin Öztemur Islakoğlu ve Alp Aydos'a, başım ne zaman sıkışsa "Bir şey sorabilir miyim?" sorusuna bıkmadan cevap veren Senem Noyan'a, yaptığım her işte her zaman yardıma hazır olan Burcu Dolapçı'ya, henüz yeni tanıdığım ama çok sevdiğim BGD lab üyeleri Begüm Karaoğlu ve Müge Öçal'a ve tabi ki Ezel Çilek ve Funda Demirsoy'a, arkadaşlıkları için Gözde Yalçın ve Özge Cumaogulları'na,

Tüm Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine,

Tez çalışmasını 19L0415003 numaralı proje kapsamında destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi ve ayrıca Türkiye Onkoloji Grubu'na,

Her zor günümde, her ihtiyacım olduğunda bütün içtenlikleri ve samimiyetleriyle yanımda olan, destek veren iş arkadaşlarım Ceren Gülgör, Melis Göçer ve Pınar Arıbal'a, akademik

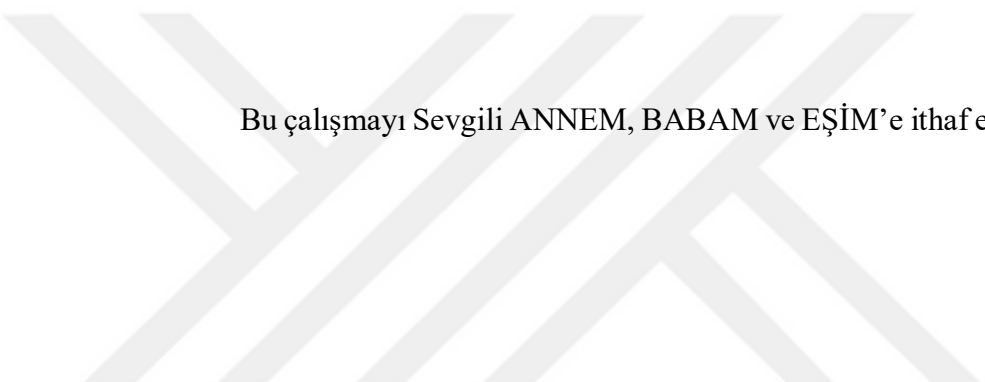
ve manevi tüm destekleri ve bana kattıkları için ablam, dostum ve hocam Doç.Dr. Merih Tepeoğlu'na ve Başkent Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda çalışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Son olarak, tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu süreçte de benimle üzülen ve benimle sevinen canlarım annem Hülya Yücel ve babam Edib Yücel'e, sonsuz sabrı, özverisi, sevgisi, desteği ve yol arkadaşlığı için canım eşim Seçkin Polat'a, her günüme neşe katan ve bu süreçteki en büyük pozitif enerji kaynaklarım sevimli tüylü dostlarım Gezi ve Köri'ye ve hayatıma giren tüm patili dostlarıma,

Teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayşegül Yücel Polat

Mayıs,2021



Bu çalışmayı Sevgili ANNEM, BABAM ve EŞİM'e ithaf ediyorum...

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                 |                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>ETİK BEYAN.....</b>                                                                                          | <b>i</b>                            |
| <b>ONAY SAYFASI.....</b>                                                                                        | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |
| <b>ÖZET.....</b>                                                                                                | <b>ii</b>                           |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                           | <b>iii</b>                          |
| <b>TESEKKÜR.....</b>                                                                                            | <b>iv</b>                           |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>                                                                                         | <b>vii</b>                          |
| <b>SEKİLLER DİZİNİ.....</b>                                                                                     | <b>xiii</b>                         |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ .....</b>                                                                                  | <b>xviii</b>                        |
| <b>SİMGELER DİZİNİ.....</b>                                                                                     | <b>xviii</b>                        |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                                                            | <b>1</b>                            |
| <b>2. KURAMSAL TEMELLER .....</b>                                                                               | <b>3</b>                            |
| 2.1. SERVİKAL KANSER .....                                                                                      | 3                                   |
| 2.1.1. SERVİKS HİSTOLOJİSİ .....                                                                                | 3                                   |
| 2.1.2. HUMAN PAPİLLOMA VİRUS (HPV) .....                                                                        | 4                                   |
| 2.1.3. SERVİKAL SKUAMUZ HÜCRELİ KARSİNOM PATOGENEZİ VE ÖNCÜL LEZYONLARIN SINIFLANDIRILMASI.....                 | 7                                   |
| 2.1.4. SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL LEZYONLARIN VE SKUAMUZ HÜCRELİ KARSİNOMUN SİTOPATOLOJİSİ VE HİSTOPATOLOJİSİ..... | 8                                   |
| 2.1.5. SERVİKAL KANSER ÖNCÜLLERİNİN ERKEN TANISINDA VE ÖNLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....                   | 11                                  |
| 2.1.5.1. Pap Test .....                                                                                         | 11                                  |

|                                                                                                |                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 2.1.5.2. HPV Testi ve HPV Aşısı .....                                                          | 13               |
| 2.2. MİKORNA'LAR.....                                                                          | 15               |
| 2.2.1. MİKORNA BİYOGENEZİ.....                                                                 | 15               |
| 2.2.2. MİRNA'LARIN ETKİ MEKANİZMASI VE GÖREVLERİ .....                                         | 16               |
| 2.3. SERVİKAL KANSER OLUŞUM VE GELİŞİMİNDE miRNA'LARIN ROLÜ.....                               | 17               |
| <b><u>3. GEREKÇE VE AMAC .....</u></b>                                                         | <b><u>21</u></b> |
| <b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM .....</u></b>                                                      | <b><u>23</u></b> |
| 4.1. MATERYAL .....                                                                            | 23               |
| 4.1.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLERDE KULLANILAN ÇALIŞMALAR.....                                   | 23               |
| 4.1.1.1. miRNA Mikrodizin Verileri .....                                                       | 24               |
| 4.1.1.2. mRNA Mikrodizin Verileri.....                                                         | 24               |
| 4.1.1.3. TCGA (The Cancer Genome Atlas) Verileri .....                                         | 25               |
| 4.1.2. DENEYSEL LABORATUVAR ANALİZLERİNDE KULLANILAN NORMAL VE HASTA ÖRNEKLERİ.....            | 25               |
| 4.1.2.1. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örnekleri .....                                                   | 25               |
| 4.1.2.2. Formalin İle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örnekleri.....                 | 28               |
| 4.1.3. RNA İZOLASYON KİTLERİ, CDNA SENTEZ REAKSİYONU KİTLERİ, QRT-PCR KİTLERİ VE CİHAZLAR..... | 31               |
| 4.1.4. PRİMERLER .....                                                                         | 32               |
| 4.1.4.1. miRNA Primerleri .....                                                                | 32               |
| 4.1.4.2. mRNA Primerleri .....                                                                 | 33               |

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ MALZEMELERİ VE HÜCRE HATLARI .....                                                                                                                                                             | 33 |
| 4.1.6. PROTEİN İZOLASYONU .....                                                                                                                                                                                     | 33 |
| 4.1.7. WESTERN BLOT DENEYLERİ İÇİN KULLANILAN CİHAZLAR VE ANTİKORLAR .....                                                                                                                                          | 34 |
| 4.1.8. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMALAR İÇİN KULLANILAN CİHAZLAR, KİTLER VE ANTİKORLAR.....                                                                                                                            | 35 |
| 4.2. YÖNTEM .....                                                                                                                                                                                                   | 36 |
| 4.2.1. PREKANSEÖZ LEZYON VE KANSER DURUMUNDA DEĞİŞEN MİRNA VE HEDEF GENLERİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ.....                                                                                                            | 37 |
| 4.2.1.1. Mikrodizin Çalışmalarının Bulunmasına Yönelik Literatür Araştırması .....                                                                                                                                  | 37 |
| 4.2.1.2. Meta-Analiz .....                                                                                                                                                                                          | 37 |
| 4.2.1.3. Mikrodizin Veri Analizi .....                                                                                                                                                                              | 37 |
| 4.2.1.4. Meta-miRNA'lar ve Hedef mRNA İlişkilerinin Elde Edilmesi.....                                                                                                                                              | 38 |
| 4.2.1.5. miRNA Hedeflerine Göre Yolak Analizi .....                                                                                                                                                                 | 39 |
| 4.2.1.6. TCGA Veri Analizleri .....                                                                                                                                                                                 | 39 |
| 4.2.1.7. Kümeleme Analizi.....                                                                                                                                                                                      | 40 |
| 4.2.2. BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR İLE NORMAL, PREKANSEÖZ LEZYON VE İNVAZİV KANSER DURUMUNDA DEĞİŞTİĞİ ÖNGÖRÜLEN MİRNA VE MRNA'LARIN SIVI-BAZLI SİTOLOJİ ÖRNEKLERİ VE FFPE DOKU ÖRNEKLERİ KULLANILARAK DOĞRULANMASI..... | 40 |
| 4.2.2.1. Normal, LSIL ve HSIL Tanısı Almış Bireylere Ait Sıvı-Bazlı Servikal Sitoloji Örneklerinin Seçimi ve Uygulanacak İşlemler İçin Hazırlanması .....                                                           | 40 |
| 4.2.2.2. Normal, LSIL, HSIL ve SCC Tanısı Almış Bireylere Ait FFPE Doku Örneklerinin Seçimi ve Uygulanacak İşlemler İçin Hazırlanması .....                                                                         | 41 |

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.2.3. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi ...                                  | 42        |
| 4.2.2.4. FFPE Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi .....                                          | 43        |
| 4.2.2.5. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örnekleri ve FFPE Doku Örneklerine Ait RNA'lar ile Mirna Çalışmaları İçin cDNA Sentezi ..... | 44        |
| 4.2.2.6. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örnekleri ve Ffpe Doku Örneklerine Ait RNA'lar ile mRNA Çalışmaları İçin cDNA Sentezi .....  | 45        |
| 4.2.2.7. Sitoloji ve FFPE Örneklerine Ait mRNA'lar Klasik PZR Yöntemi ile Kontrolü ..                                     | 46        |
| 4.2.2.8. Sitoloji ve FFPE Örneklerinde miRNA İfadelerinin qRT-PCR Yöntemi ile Doğrulanması.....                           | 46        |
| 4.2.2.9. Sitoloji Örneklerinde mRNA İfadelerinin qRT-PCR Yöntemi ile Doğrulanması ..                                      | 47        |
| 4.2.2.10. KLF4 Protein Düzeyinin FFPE Doku Örneklerinde İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi .....    | 47        |
| 4.2.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ İLE DOĞRULAMA ÇALIŞMALARI.....                                                             | 48        |
| 4.2.3.1. Hücre Kültürü Sisteminin Kurulması ve Devam Ettirilmesi .....                                                    | 48        |
| 4.2.3.2. Transfeksiyon.....                                                                                               | 49        |
| 4.2.3.3. Hücre Proliferasyonunun Araştırılması .....                                                                      | 49        |
| 4.2.3.4. Hücrelerin Motilitelerinin Belirlenmesi .....                                                                    | 50        |
| 4.2.4. PROTEİN İZOLASYONU.....                                                                                            | 50        |
| 4.2.5. WESTERN BLOT DENEYLERİ.....                                                                                        | 51        |
| 4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....                                                                                       | 53        |
| <b>5. ARASTIRMA BULGULARI .....</b>                                                                                       | <b>54</b> |
| 5.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER SONUCUNDA ELDE EDİLEN BULGULAR ..                                                           | 54        |

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.1. META-ANALİZ SONUCUNDA ELDE EDİLEN MİRNA LİSTESİ.....                                                    | 54 |
| 5.1.2. GRUPLAR ARASINDA İFADESİ DEĞİŞEN MRNA'LARIN BELİRLENMESİ.....                                           | 55 |
| 5.1.3. META-MİRNA HEDEFLERİNİN BİYOİNFORMATİK OLARAK BELİRLENMESİ VE DE MRNA'LAR İLE KARŞILAŞTIRILMASI.....    | 57 |
| 5.1.4. META-MİRNA'LARIN HEDEFLERİNİN ROL OYNADIĞI SİNYAL YOLAKLARI.....                                        | 59 |
| 5.1.5. TCGA VERİ ANALİZİ.....                                                                                  | 60 |
| 5.1.6. META-MİRNA HEDEFLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN KÜMELEME ANALİZİ SONUÇLARI .....                              | 63 |
| 5.2. DENEYSEL ANALİZLER SONUCUNDA ELDE EDİLEN BULGULAR.....                                                    | 63 |
| 5.2.1. REFERANS GEN SEÇİMİ .....                                                                               | 63 |
| 5.2.2. SİTOLOJİ VE FFPE ÖRNEKLERİNDE MİRNA İFADELERİNE AİT QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI.....                      | 65 |
| 5.2.3. SİTOLOJİ ÖRNEKLERİ MRNA DENEYLERİ İÇİN SENTEZLENEN CDNA'LARIN KONTROLÜNE AİT KLASİK PZR SONUÇLARI ..... | 68 |
| 5.2.4. FFPE ÖRNEKLERİ MRNA DENEYLERİ İÇİN SENTEZLENEN CDNA'LARIN KONTROLÜNE AİT KLASİK PZR SONUÇLARI.....      | 69 |
| 5.2.5. SİTOLOJİ ÖRNEKLERİNDE MRNA İFADELERİNE AİT QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI .....                              | 70 |
| 5.2.6. KLF4 İFADESİNİN FFPE DOKULARDAKİ DEĞİŞİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....                                     | 72 |
| 5.2.7. <i>İN VİTRO</i> ÇALIŞMALAR.....                                                                         | 74 |
| 5.2.7.1. MİR-25'İN HELA HÜCRELERİNDE KLF4 PROTEİN DÜZEYİ, PROLİFERASYON VE MOTİLİTE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ .....    | 74 |

|                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>6. TARTISMA VE SONUC.....</b>                                     | <b>80</b>  |
| 6.1. TARTIŞMA.....                                                   | 80         |
| 6.2. SONUÇ.....                                                      | 87         |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                                                | <b>89</b>  |
| <b>EKLER.....</b>                                                    | <b>103</b> |
| Ek 1: Etik kurul onayı.....                                          | 101        |
| Ek 2: Sitoloji ve FFPE örneklerine ait RNA izolasyonu sonuçları..... | 103        |
| <b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                                 | <b>106</b> |
| <b>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</b>                                    | <b>108</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Servikal çok katlı yassı epitel hücre katmanları (5) .....                                                                                                                               | 4  |
| Şekil 2.2. HPV genomunun detaylı gösterimi (6).....                                                                                                                                                 | 5  |
| Şekil 2.3. HPV'nin epitel hücre maturasyonu ile yayılımı (6).....                                                                                                                                   | 6  |
| Şekil 2.4. HPV yayılımının, servikal prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser durumunda epitel hücre katmanlarında görülen değişikliklerin şematik gösterimi (13).....                               | 8  |
| Şekil 2.5. Servikal prekanseröz lezyonlar ve SCC hücrelerinin sitolojik görünüşleri .....                                                                                                           | 10 |
| Şekil 2.6. Servikal prekanseröz lezyonlar ve SCC'nin histolojik görünüşleri.....                                                                                                                    | 11 |
| Şekil 2.7. miRNA biyogenezi (41) .....                                                                                                                                                              | 16 |
| Şekil 2.8. miRNA'nın hedef mRNA ile etkileşimi.....                                                                                                                                                 | 17 |
| Şekil 2.9. Viral E6 ve E7 proteinlerinin pRb ve P53 yolları üzerindeki etkisi ve miRNA'ların bu süreçlerdeki rolü (21).....                                                                         | 20 |
| Şekil 4.1. İş akış şeması .....                                                                                                                                                                     | 36 |
| Şekil 4.2. Meta-miRNA hedeflerinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan internet araçları .....                                                                                                     | 39 |
| Şekil 5.1. Farklı internet veri tabanlarından elde edilen meta-miRNA hedefleri ve mRNA analizi kullanılarak belirlenen, gruplar arasında ifadesi değişen ortak mRNA sayılarına ait ven şeması ..... | 57 |
| Şekil 5.2. İlk 10 meta-miRNA'ya ait sinyal yolağı zenginleştirme analizi sonuçları .....                                                                                                            | 60 |
| Şekil 5.3. CESC veri seti kullanılarak elde edilen TCGA veri analizi sonuçları, Mann Whitney U, $p < 0.05$ .....                                                                                    | 61 |
| Şekil 5.4. Hedef mRNA'lar ile CESC veri seti kullanılarak elde edilen TCGA veri analizi sonuçları, Mann Whitney U, $**p < 0.01$ .....                                                               | 62 |

|                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.5 .mRNA analizleri ile öne çıkan DE mRNA'lar ile yapılan kümeleme analizine ait heatmap. Örnekler ilgili mRNA ifade durumlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kümelenmişlerdir, Mann-Whitney U, $p<0.01$ ..... | 63 |
| Şekil 5.6. Sitoloji örneklerinde tüm gruplara ait örnekler ile RNU6, miR-23a ve miR-191 primerleri kullanılarak yapılan qRT-PCR deneyleri sonucunda elde edilen ct değerlerinin dağılımına ait box-plot grafiği.....                   | 64 |
| Şekil 5.7. Sitoloji (A) ve FFPE (B) doku örneklerinde miR-25 ifadesinin gruplar arasındaki değişimi, Mann Whitney U, *p .....                                                                                                          | 65 |
| Şekil 5.8. miR-25, let-7i, miR-26a, miR-29a ve let-7d ifadelerinin sitoloji ve FFPE örneklerinde normal, LSIL, HSIL ve SCC grupları arasında ifade değişimlerine ait box-plot grafikleri .....                                         | 67 |
| Şekil 5.9. Sitoloji örnekleri ile yapılan mRNA-cDNA'larının klasik PZR ürünlerine ait jel görüntüleri .....                                                                                                                            | 69 |
| Şekil 5.10. FFPE örnekleri ile yapılan mRNA-cDNA'larının klasik PZR ürünlerine ait jel görüntüleri A) Normal grup B)LSIL grubu C)HSIL grubu D)SCC grubu .....                                                                          | 70 |
| Şekil 5.11. Sitoloji örneklerinde KLF4 ve miR-25 ifadelerinin normal ve LSIL+HSIL gruplarındaki ifade düzeyleri, Mann Whitney U, * $p<0.05$ , ** $p<0.01$ .....                                                                        | 71 |
| Şekil 5.12. Sitoloji örneklerinde TUBB2A'nın normal, LSIL ve HSIL derecelerindeki ifade düzeyi, Kruskal Wallis, * $p<0.05$ , ** $p<0.01$ .....                                                                                         | 71 |
| Şekil 5.13. MiR-25 ve KLF4 ifadelerinin FFPE doku örneklerindeki farklı gruplara göre değişimleri. ....                                                                                                                                | 73 |
| Şekil 5.14. FFPE doku örneklerinde farklı gruplardaki KLF4 boyanmasına ait örnek fotomikrograflar.....                                                                                                                                 | 74 |
| Şekil 5.15. İnhibitör ile transfeksiyon sonrasında miR-25 ifadesinde artış görülmüştür.....                                                                                                                                            | 75 |
| Şekil 5.16. HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonunun KLF4 protein düzeyi üzerine etkisi .....                                                                                                                                           | 75 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.17. HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonunun proliferasyon üzerine etkisi. ....           | 76 |
| Şekil 5.18. HeLa hücrelerinde miR-25'in motilite üzerinde etkisi. ....                           | 78 |
| Şekil 5.19. HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonunun SNAIL protein düzeyi üzerine etkisi<br>..... | 79 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.1. Literatür araştırması sonucunda serviks kanseri oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA ve mRNA'ları belirlemek amacıyla seçilen mikrodizin çalışmalarının erişim kodu, veri tipi, örnek sayıları ve platform özellikleri. ....     | 23 |
| Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen sıvı-bazlı servikal sitoloji örneklerinin numaraları, yaş ve HPV durumu bilgileri.....                                                                                                                       | 26 |
| Çizelge 4.3. Çalışmaya dahil edilen FFPE örneklerinin numaraları, yaş ve HPV durumu bilgileri .....                                                                                                                                              | 29 |
| Çizelge 4.4. qRT-PCR'de kullanılan miRNA primerlerinin isimleri, MIMAT numarası, Qiagen ürün adı bilgileri ve genomik dizisi .....                                                                                                               | 32 |
| Çizelge 4.5. Klasik ve qRT-PCR'de kullanılan mRNA primerlerine ait bilgiler .....                                                                                                                                                                | 33 |
| Çizelge 4.6. Western Blot işlemlerinde kullanılan antikorlar .....                                                                                                                                                                               | 34 |
| Çizelge 4.7. Klasik PZR yönteminde kullanılan reaktifler ve miktarları.....                                                                                                                                                                      | 46 |
| Çizelge 4.8. qRT-PCR yönteminde kullanılan reaktifler ve miktarları .....                                                                                                                                                                        | 47 |
| Çizelge 4.9. qRT-PCR yönteminde kullanılan reaktif ve miktarları .....                                                                                                                                                                           | 47 |
| Çizelge 4.10. Transfeksiyon yapılan hücrelerden elde edilen protein miktarları .....                                                                                                                                                             | 51 |
| Çizelge 4.11 .Resolving jel malzemeleri ve kullanım miktarları .....                                                                                                                                                                             | 52 |
| Çizelge 4.12. Stacking jel malzemeleri ve kullanım miktarları .....                                                                                                                                                                              | 52 |
| Çizelge 5.1. Meta-analiz ile gruplar arasında ifade farklılığı gösterdiği belirlenen miRNA'ların listesi.....                                                                                                                                    | 54 |
| Çizelge 5.2. Gruplar arasında ifadesi değişen mRNA listesi .....                                                                                                                                                                                 | 56 |
| Çizelge 5.3. Farklı internet veri tabanları kullanılarak belirlenen meta-miRNA hedef listeleri ve mRNA analizi sonucunda gruplar arasında ortak olarak ifadesi değişen mRNA'ların karşılaştırması sonucu elde edilen mRNA'lara ait listeler..... | 58 |

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 5.4. Belirlenen mRNA hedeflerinin mikrodizin verileri kullanılarak yapılan analizler sonucunda belirlenen gruplar arasındaki değişim yönleri.....                   | 59 |
| Çizelge 5.5. Meta-miRNA'lar ve hedeflerinin normalden tümöre doğru değişim yönü .....                                                                                       | 62 |
| Çizelge 5.6.Çalışmaya dahil edilen meta-miRNA ve hedefleri.....                                                                                                             | 62 |
| Çizelge 5.7. Sitoloji örnekleri ile yapılan qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen değerlere ait istatistik sonuçları ( $p \leq 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir).....  | 68 |
| Çizelge 5.8. FFPE doku örnekleri ile yapılan qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen değerlere ait istatistik sonuçları ( $p \leq 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir)..... | 68 |
| Çizelge 5.9. miR-25 hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizi sonuçları.....                                                                                             | 77 |

## SİMGELER DİZİNİ

|         |                                                 |
|---------|-------------------------------------------------|
| AGO     | Argonat                                         |
| ASCUS   | Önemi belirlenemeyen atipik skuamoz hücreler    |
| ATCC    | American Type Culture Collection                |
| CIN     | Servikal intraepitelyal neoplazi                |
| DE      | İfade farklılığı gösteren                       |
| FFPE    | Formalin fikse parafine gömülü                  |
| GEO     | Gene Expression Omnibus                         |
| HPV     | Human Papilloma Virus                           |
| HSIL    | Yüksek dereceli intraepitelyal lezyon           |
| KLF4    | Kruppel-like factor 4                           |
| LBC     | Sıvı bazlı sitoloji                             |
| LCR     | Uzun kontrol bölgesi                            |
| LSIL    | Düşük dereceli intraepitelyal lezyon            |
| miRNA   | MikroRNA                                        |
| PVDF    | Polyvinylidene fluoride                         |
| qRT-PCR | Eş zamanlı PZR                                  |
| SCC     | Skumoz hücreli karsinoma                        |
| TCGA    | İnsan genom atlası                              |
| uPA     | Urokinaz-tipi plazminojen aktivatör             |
| URR     | Upper regulatory region (Üst düzenleyici bölge) |

|     |                                                 |
|-----|-------------------------------------------------|
| UTR | Translasyonu yapılmaya bölge                    |
| WHA | Wound Healing Assay (Yara iyileşme deneyi)      |
| WHO | World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü) |



## 1. GİRİŞ

Servikal kanser dünyada kadınlar arasında oldukça yaygın olarak görülen ve ölüm oranı yüksek bir kanser türüdür. Servikal kanserlerin oluşum ve gelişimindeki en önemli etken Human Papilloma Virüs (HPV)'tür. Pap smear taraması ve HPV testi servikal kanserlerin öncül lezyonlarının saptanarak invaziv kanser oluşumunun önlenmesinde kullanılan ana yöntemlerdir. Buna ek olarak hastalığın önlenmesi amacıyla HPV aşıları uygulanmaktadır. Ancak Pap test değerlendirmesi uluslararası tanı kriterlerine göre yapılmasına rağmen tanı koyma sırasında patologlar arasında fikir farklılıkları oluşması, Pap test sonucu benign ancak HPV testi pozitif vakaların yönetimindeki zorluklar ve beraberinde cerrahi müdahalelerin uygulanmasında artış meydana gelmesi, patolojik değerlendirmede lezyon derecelerini birbirinden ayırmak için kullanılan biyobelirteç azlığı ve aşılarda yaygın olarak uygulanamaması gibi sebepler servikal kanserlerin öncül lezyonlarının saptanmasında yeni biyobelirteçlerin tanımlanması gereğini oluşturmaktadır. Mikro RNA (miRNA)'ların hedef genlerinin ifadelerini baskılayarak kanser süreçlerinde önemli rol oynadığının anlaşılması ile beraber servikal kanser oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA'lar ve hedefleri de araştırılmaya başlanmıştır. Ancak şu ana kadar rutin kullanım için belirlenmiş bir miRNA ve hedefi bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında biyoinformatik ve laboratuvar yöntemleri bir arada kullanılarak hem rutin taramada kullanılan sitoloji örneklerinde hem de doku örneklerinde öncül lezyonlarda ve invaziv kanser durumunda normal örneklerle göre ifadesi değişen miRNA'ların ve hedeflerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasında yapılan işler aşağıdaki gibidir;

1. Servikal kanser ve öncülü örnekler ile yapılmış miRNA ve gen ifade mikrodizin çalışmalarının bulunmasına yönelik literatür araştırması
2. Mikrodizin verilerine biyoinformatik analizler uygulanarak normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser arasında ifade farklılığı (DE) gösteren miRNA ve mRNA'ların belirlenmesi
3. miRNA hedefleri ve belirlenen DE mRNA'lar'ın karşılaştırılması

4. Elde edilen verilerin İnsan genom atlası (TCGA) verileriyle karşılaştırılması ve sinyal yolağı zenginleştirme analizlerinin gerçekleştirilmesi, ileri analizlerde çalışılacak miRNA ve hedef genlerin belirlenmesi
5. Bağımsız sitoloji ve doku örnekleri kullanılarak eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) deneyleri ile biyoinformatik analizlerle belirlenmiş potansiyel belirteç miRNA ve hedef mRNA ifadelerinin normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser durumlarındaki değişiminin araştırılması
6. Önceki deneyler ile servikal kanser oluşum ve gelişiminde en etkili olduğu düşünülen miRNA ve hedeflerinin hücre kültürü deneyleri ile doğrulanması



## **2. KURAMSAL TEMELLER**

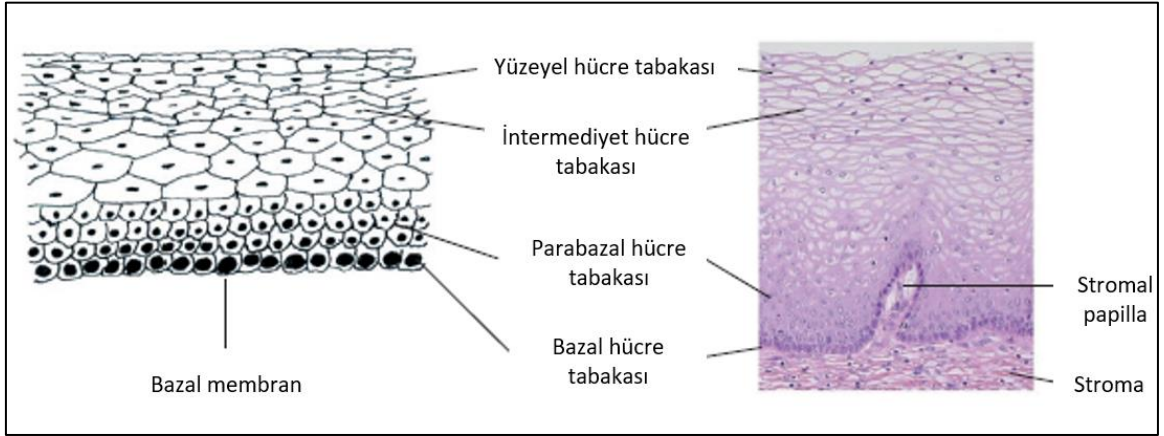
### **2.1. SERVİKAL KANSER**

Servikal kanser tüm dünyada kadınlar arasında insidans ve mortalite açısından 4. sırada yer almaktadır. 2018 yılında Dünya Sağlık örgütünün (WHO) yaptığı çalışmada dünya çapında 570.000 yeni olgu bulunduğu ve bunlardan 311.000 olgunun ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir (1). Erken tanılama yöntemlerinin yaygınlaşması ve aşılama yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte özellikle yüksek gelirli ülkelerde son 30 yılda insidans ve ölüm oranı yarı yarıya azalmış olmasına rağmen düşük ve orta gelirli ülkelerde bu oranlar oldukça yüksektir (2). Servikal kanserlerin %75'ini skuamoz hücreli karsinom (SCC) oluştururken, geriye kalan tiplerden en yaygın olarak adenokarsinom görülmektedir. Servikal kanser gelişiminde birçok faktör bir arada rol oynasa da servikal kanserlerin büyük çoğunluğuna Human Papilloma Virus (HPV)'ün sebep olduğu bilinmektedir (3).

#### **2.1.1. SERVİKS HİSTOLOJİSİ**

Serviks iki farklı epitel tipi ile döşelidir. Ektoserviks kısmı skuamoz epitel ile kaplı iken, endoserviks glanduler epitel ile kaplıdır. Bu iki bölge arasında endoservikal epitelden skuamoz epitele dönüşüm gösteren metaplastik hücrelerle kaplı ve servikal kanser gelişiminin en yaygın olarak görüldüğü transformasyon zonu görülmektedir. Epitel hücre tabakasının altında bağ doku ve kas dokusu bulunur. Hem epitel katmanı hem de daha alt katmanlar T ve B lenfositler, plazma hücreleri, NK hücreleri, makrofajlar ve antijen sunucu Langerhans hücrelerinden oluşan bölgesel servikal immün sistem elemanlarını bulundurmaktadır (4). Servikal skuamoz epitel tabakası çok katlı ve non-keratinize özelliktedir. Bazal membran skuamoz epitel ve stromayı birbirinden ayırmaktadır. Skuamoz epitel tabakasının en alt kısmı bazal membran ile bağlantı, oval şekilli, küçük sitoplazmalı, büyük ve koyu renkli boyanan nükleuslu bazal hücrelerden oluşur. Bazal hücreler bölünerek ve olgunlaşarak daha üst katmanda bulunan parabazal hücreleri oluşturur. Bu hücreler koyu boyanan büyük çekirdekli, bazofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Bu hücrelerin olgunlaşması ile büyük ve poligonal sitoplazmalı, küçük, oval çekirdekli intermediyet hücre tabakası oluşur. Son olarak intermediyet hücreler olgunlaşarak küçük piknotik çekirdekli, büyük ve basık sitoplazmalı yüzeyel hücre tabakasını oluşturur. Özetle bazal hücre tabakasından yüzeyel

tabakaya doğru gidildikçe sitoplazma büyürken, çekirdek boyutu küçülür (Şekil 2.1.). İntermediyet ve yüzeyel tabakadaki hücreler sitoplazmalarında bol miktarda glikojen içermektedirler. Bu hücrelerdeki glikojenizasyon normal bir skuamöz epitel gelişiminin ve maturasyon sürecinin belirtecidir. Servikal skuamöz epitelin maturasyonu östrojene bağlı olarak gerçekleşir. Östrojen yokluğunda glikojenizasyon ve maturasyon görülmez. Örneğin, menopozdan sonra maturasyon durur ve parabazal hücre tabakasının üzerindeki katmanlar görülmez. Epitel tabaka ince ve atrofik durumdadır (5).



Şekil 2.1. Servikal çok katlı yassı epitel hücre katmanları (5)

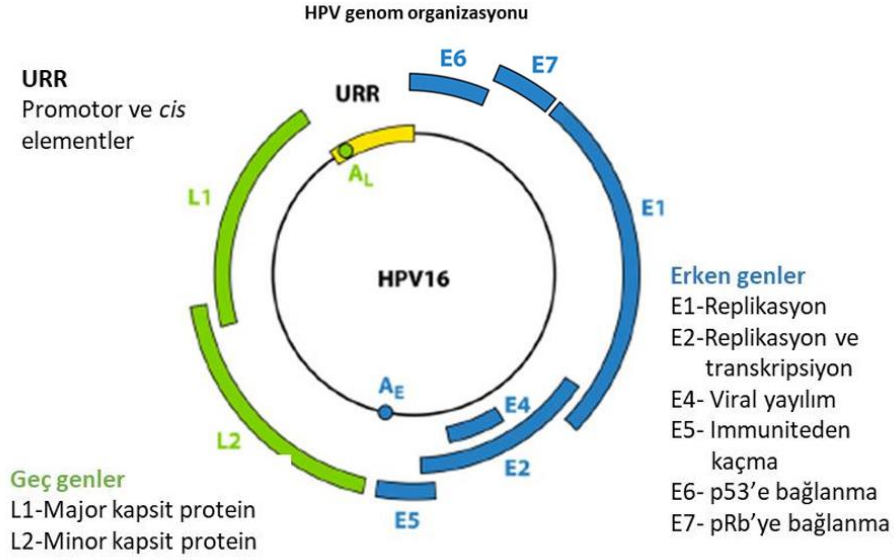
### 2.1.2. HUMAN PAPİLLOMA VİRUS (HPV)

Human Papilloma Virus (HPV) bir DNA virüsüdür ve genetik materyali yaklaşık 8000 baz çiftinden oluşan, çift zincirli, sirküler bir DNA molekülüdür. 180'den fazla farklı HPV tipi tanımlanmıştır ve bunlardan yaklaşık 40 tanesi genital mukozayı enfekte etmektedir. HPV benign lezyonlardan invaziv tümöre kadar farklı hastalıkların oluşumuna neden olmaktadır.

HPV tipleri servikte malign lezyon oluşturma potansiyellerine göre düşük ve yüksek riskli olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Düşük riskli olanlardan en yaygın olarak görülen tipler HPV6 ve HPV11'dir. Bu HPV tipleri benign genital siğillerin yaklaşık %90'ının oluşumuna sebep olurlar. Yüksek riskli HPV tipleri olan HPV16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 58 vb. ise servikal kanserlerin %90'ından fazlasıyla ilişkilidirler. Özellikle HPV16 servikal kanser olgularının yaklaşık yarısında görülürken, HPV18 de kalan kısmın %10-20'sini oluşturmaktadır.

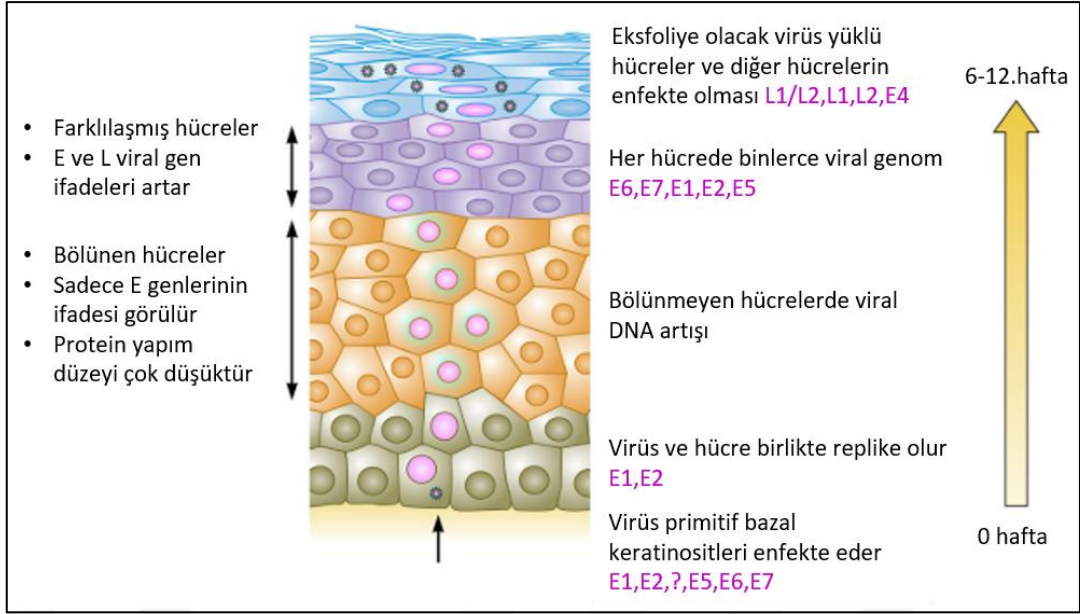
HPV genomu 3 ana bölüme ayrılmıştır;

- 1) Yapısal olmayan proteinleri kodlayan yaklaşık 4kb 'lık erken (early=E) bölge
- 2) İki kapsit proteinini kodlayan yaklaşık 3kb 'lık geç (late=L) bölge
- 3) Viral replikasyonu ve gen ekspresyonunu regüle eden *cis* elementlerini içeren yaklaşık 1 kb'lık kodlanmayan uzun kontrol bölgesi (Long control region=LCR ya da upper regulatory region=URR) (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. HPV genomunun detaylı gösterimi (6)

HPV'nin yaşam döngüsü enfekte olmuş epitelin farklılaşma programı ile bağlantılıdır. HPV ilk olarak epitel tabakasının sadece aktif olarak bölünebilme özelliğine sahip bazal epitel hücrelerini  $\alpha$ -6 integrin gibi özel reseptörler aracılığıyla enfekte ederler. Viral DNA enfekte olmuş bazal epitel hücrelerinde hücre başına yaklaşık 50-100 kopya sayısında bulunur ve düşük bir seviyededir. Enfekte olmuş hücreler bulundukları primitif bölgeyi terk ederek epitelin proliferatif bölgesine doğru ilerlerler. Bu aşamada viral kopya sayısı ve gen ifadesi minimal düzeydedir. Onkogenik E6 ve E7 gen ifadeleri sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Daha sonra bu enfekte olmuş hücreler epitelin farklılaşma bölgesine girerler ve hücrelerin bölünmesiyle birlikte viral gen ifadesi ve viral DNA replikasyonu aşırı bir şekilde artar. Bu şekilde binlerce viral kopya sayısı her hücrede görülmeye başlar, E6, E7 erken genleri ve geç genlerin ifadesi artar. Bazal epitel hücreler farklılaştıkça virüs ile enfekte olmuş hücreler serviks epitelinin yüzeyine doğru yayılmış olur (Şekil 2.3.) (6)(7).



Şekil 2.3. HPV'nin epitel hücre maturasyonu ile yayılımı (6)

Virüs E1 ve E2 proteinleri viral genom replikasyonunda önemli rol oynarlar. E1 geni viral DNA helikaz enzimini kodlar. E2 proteini, viral genomdaki URR bölgesindeki belirli motiflere bağlanır ve viral gen ifadesinde transkripsiyonu baskılayıcı olarak görev yapar. HPV ilişkili karsinogenezin en önemli basamağı HPV genomunun konakçı kromozomuna entegrasyonudur. Virüs konak hücreye girdikten sonra E2 proteininin ifadesinin durması ya da fonksiyon kaybının görülmesi özellikle malign transformasyonda önemli rolleri olan onkojenik E6 ve E7'nin malignite oluşturma sürecinde görev yapabilmeleri için gereklidir. Bu nedenle E2 başta olmak üzere viral DNA'nın diğer bölgeleri konakçı hücre içinde silinirken ya da ifadesi bozulurken, viral E6 ve E7 genleri konakçı DNA'sına entegre olur ve bu bölgelerin ifadesinin sürekli olarak devam etmesi sağlanır (6)(8).

Viral E6 ve E7 proteinleri konakçının özellikle hücre döngüsünde görev alan proteinlerini etkileyerek servikal epiteldeki karsinogenez sürecinde önemli rol oynarlar. HPV E6 geni 150 aminoasitlik bir protein kodlar ve bu protein önemli bir tümör baskılayıcı olan p53'ü hedefler. Normal bir hücrede p53 proteini ifadesi DNA hasarı sonrasında artar ve hücre döngüsü G1 fazında kalacak şekilde durdurulur. Bu süreçte ya DNA hasarı giderilir ya da DNA tamiri mümkün değil ise hücre apoptoz sürecine girer. Aynı zamanda p53 siklin bağımlı kinazların inhibisyonuna sebep olur ve Retinoblastoma (Rb)'nın fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur. HPV E6 proteini ubiquitin bağımlı proteolitik yıkım yoluyla p53'ün degradasyonunu stimüle ederek görevini yapamamasına

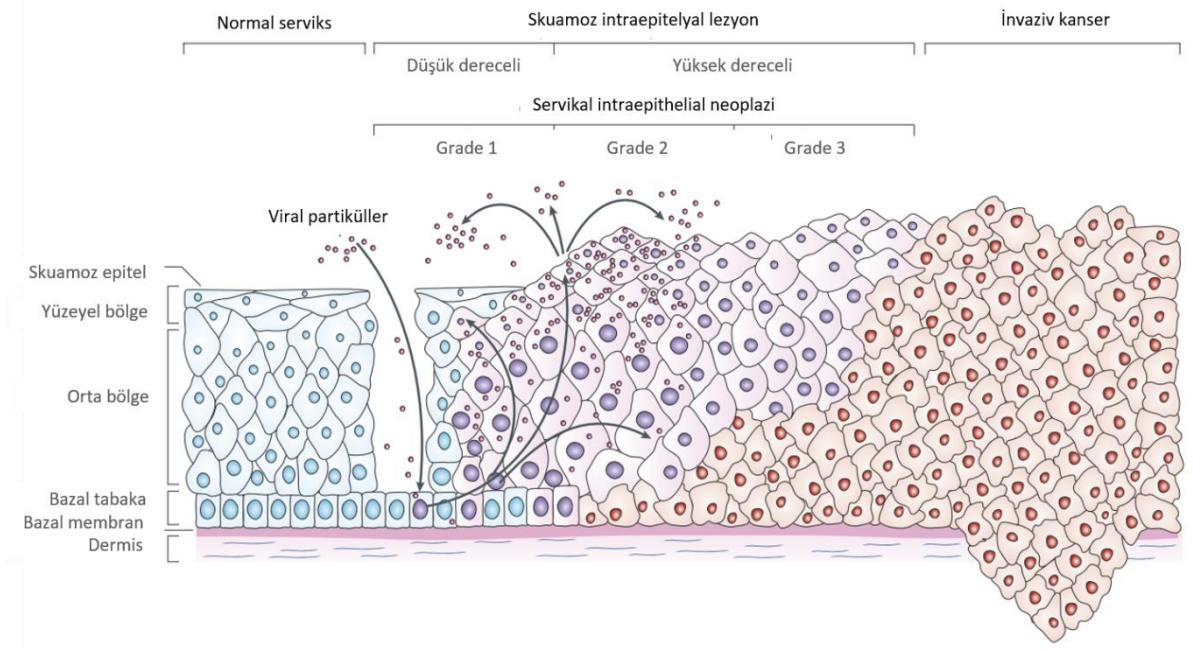
sebepe olur. HPV'nin bir diğere onkojenik proteini olan E7 ise 98 amino asitlik bir fosfoproteindir. Hücre döngüsünde rol oynayan ve tümör baskılayıcı görevi olan Rb proteini üzerinde etkilidir. Rb proteini normal hücrelerde hipofosforile formda aktiftir ve E2F ailesindeki transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücreleri hücre döngüsünün G1 fazında durdurur. E7 proteini Rb'yi fosforile ederek inaktive olmasına neden olur ve transkripsiyon faktörleri serbest kalarak hücre döngüsünün devam etmesi sağlarlar. Bu şekilde her iki HPV proteini konakçı hücrenin hücre döngüsündeki kontrol süreçlerini bozarak kontrolsüz hücre bölünmesine sebepe olurlar ve kanser oluşum sürecine katkı sağlarlar (9).

### **2.1.3. SERVİKAL SKUAMUZ HÜCRELİ KARSİNOM PATOGENEZİ VE ÖNCÜL LEZYONLARIN SINIFLANDIRILMASI**

HPV virionları ilk olarak çok katlı skuamoz epitelin bazal tabakasındaki hücreleri enfekte eder ve HPV E6 ve E7 gen ürünlerinin ifadesinin artması ile bu hücrelerin proliferasyonu artar ve maturasyon ile tüm epitel katmanları HPV ile enfekte olmuş olur. Bu aşamalarda aynı zamanda HPV E4 ifadesiyle birlikte hücrelerde sitopatik değişiklikler görülmeye başlar. Hücrelerin sitoplazmalarındaki sitokeratinin yıkılması ve tonofilamentlerin hücrenin perifer kısımlarında yoğunlaşmasıyla sitoplazmada “perinükleer hale” adı verilen sitoplazmik boşluklar meydana gelir ve böylece koilosit adı verilen hücreler oluşur. Bu sitoplazmik parçalanmaların viral partiküllerin epitelin üst tabakalarındaki hücrelerden salınmasına ve yayılmasına sebepe olduğu düşünülmektedir (7)(10).

HPV'nin sebepe olduğu sitolojik değişikliklerin yaygın olarak görüldüğü, bazal ve parabazal hücre proliferasyonunun orta dereceli atipi ve mitoz ile karakterize olduğu bu enfektif durum düşük dereceli skuamoz intraepitelyal lezyon (Low grade squamous intraepithelial lesion=LSIL) olarak adlandırılır. Yüksek dereceli skuamoz intraepitelyal lezyonlar (High grade squamous intraepithelial lesion=HSIL) ise gerçek prekanseröz lezyonlar olarak kabul edilir. HSIL küçük ve orta büyüklükteki atipik bazal hücrelerden oluşur. LSIL ve HSIL farklı patogeneze göstermektedir. LSIL'ların sadece belli bir alt grubu HSIL'a ilerlerken genellikle birkaç yıl içinde gerilemektedir. Ancak HSIL kalıcı bir durumdur ve büyük çoğunlukla bu hücreler bazal membranı kırarak bağ dokuya geçmekte ve SCC'ye doğru ilerleme görülmektedir. Eski sınıflama yönteminde bu lezyonların histopatolojik sınıflandırılmasında servikal intraepitelyal neoplazi (Cervical intraepithelial neoplasia =CIN) isimlendirilmesi

kullanılmaktadır. CIN1 kategorisi LSIL'a karşılık gelirken, CIN2 ve CIN3 kategorileri HSIL'a karşılık gelmektedir. Sitolojik ve histolojik adlandırmalardaki farklılıkların getirdiği karışıklıklar, LSIL ve HSIL patogenezinin farklı olması, LSIL'ın çoğunlukla düşük orta risk grubundaki HPV tipleriyle, HSIL'ın yüksek riskli HPV tipleri ile ilişkili olması ve iki lezyon tipinin farklı hücre tipleriyle karakterize olması servikal prekanseröz lezyonların sınıflandırılmasında ikili sınıflandırmaya geçilmesine neden olmuştur (Şekil 2.4.) (11)(12).



Şekil 2.4. HPV yayılımının, servikal prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser durumunda epitel hücre katmanlarında görülen değişikliklerin şematik gösterimi (13)

#### 2.1.4. SERVİKAL İNTRAEPİTELYAL LEZYONLARIN VE SKUAMOZ HÜCRELİ KARSİNOMUN SİTOPATOLOJİSİ VE HİSTOPATOLOJİSİ

Pap smear'lerde görülen hücrelerin sitolojik değerlendirilmesi Bethesda Sistemi kriterlerine göre yapılmaktadır. Skuamoz hücrelerde meydana gelen değişiklikler ve bu değişikliklerin ait olduğu lezyonların dereceleri değerlendirilirken özellikle çekirdek boyutu ve sitoplazma özelliklerine göre karar verilmektedir.

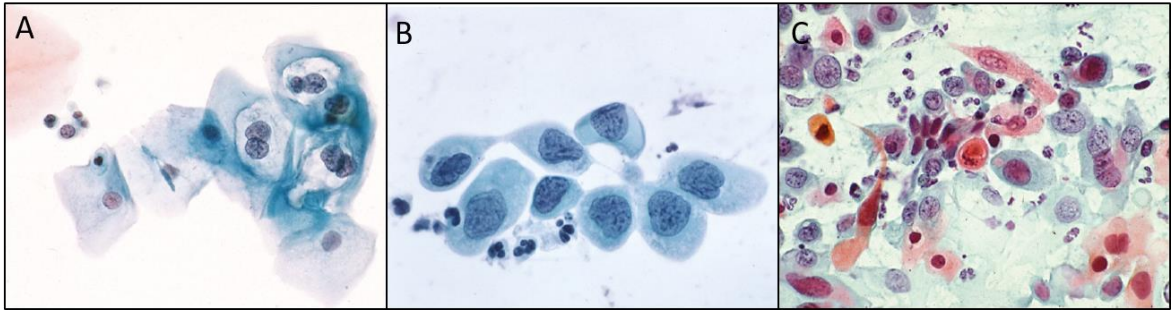
Özellikle HPV enfeksiyonu ile ilişkili hücresel değişikliklerin görüldüğü lezyonlar LSIL kategorisinde değerlendirilir. Hücreler tek tek, gruplar ya da tabakalar halinde görülebilir. Hücresel değişiklikler genellikle intermediyet ya da yüzeysel hücrelerde görülmektedir.

Nükleus normal intermediyer hücre çekirdeğinin 3 katından fazla büyür, nükleus/ sitoplazma oranı artar ve genellikle hiperkromatik görünümündedir. Kromatin yapısı granüler ya da yoğun opak şekilde görünebilir. Nükleer membran irregüler ya da düzgün olabilir. Binükleasyon ya da multinükleasyon yaygın olarak görülmektedir. Nükleusun etrafında LSIL'a özgün, viral sitopatik etkinin ortaya çıkardığı "koilos" adı verilen perinükleer şeffaf bir alan dikkati çekmektedir. Hücreler eozinofilik bir şekilde görülen artmış keratinizasyon gösteren sitoplazmaya sahip olabilir (Şekil 2.5.A.).

İnvaziv tümörün bir önceki basamağı olan ve gerçek bir prekanseröz lezyon olarak kabul edilen HSIL'a ait hücrelerin maturasyonu LSIL durumunda görülen hücrelere göre daha azdır, sitoplazmalar daha küçüktür ve bazal hücre tipindedirler. Hücreler tek tek ya da tabakalar halinde olabilir. HSIL hücrelerinden oluşan gruplar hiperkromatik kalabalık topluluklar olarak görülebilir. Nükleer büyüme LSIL'daki kadar ya da daha fazla olabilmekle birlikte sitoplazmanın daha küçük olması sebebiyle nükleus/sitoplazma oranı iyice artmıştır. Nükleus genellikle hiperkromatiktir, ancak bazı durumlarda hipokromatik olarak da görülebilmektedir. Kromatin düzgün, granüler ya da dağılmış şekilde olabilir. Nükleer membran girintili çıkıntılı ve oldukça irregülerdir. Sitoplazma dens ya da açık renkli olabilir, bazen de yoğun bir keratinizasyon izlenebilir (Şekil 2.5.B.).

SCC durumunda ise hücreler büyük çoğunlukla izole tek tek düşmüş hücreler halinde görülürler. Hücre büyüklüğü değişkenlik göstermekle birlikte hücre tipi SCC'ye karakterize olan uzamış, sıklıkla keratinize sitoplazmalı iğsi hücrelerdir. Nükleus önemli ölçüde dikkat çekici bir durumdadır ve oldukça hiperkromatiktir. Nükleer membran irregülerdir. Kromatin paterni granüler ya da kromatin şeffaflaşması ile irregüler bir görünümde olabilir. Makronükleol varlığı, tümör diyatezine ait nekrotik debris ve parçalanmış kan elemanları non-keratinize SCC'de keratinize SCC'ye göre daha çok görülebilir (Şekil 2.5.C.) (14).

Tüm bu kriterler malign hücrelerin normal hücrelerden ayrılmasında oldukça başarılı olsa da yaymada gözlenebilecek farklı kökenleri olan bazı normal hücrelerin anormal hücrelere olan benzerlikleri ve reaktif durumlarda görülen bazı hücresel değişikliklerin malignite kriterleri ile karıştırılabilme olasılığı her kategori için yanıltıcı durumlar oluşturabilmektedir.



Şekil 2.5. Servikal prekanseröz lezyonlar ve SCC hücrelerinin sitolojik görünümü A) LSIL; nükleus etrafında koilos, binükleasyon, nükleer irileşme ve hiperkromatizm dikkati çekmektedir B) HSIL; azalmış nükleus/sitoplazma oranı, irileşmiş, membran düzensizliği içeren ve hiperkromatik nükleus ile karakterli hücreler C) SCC, içsi sitoplazmalı, keratinize SCC'ye özgül keratinizasyon, aşırı hiperkromatik, irileşmiş ve membran düzensizliği gösteren hücreler görülmektedir (14)

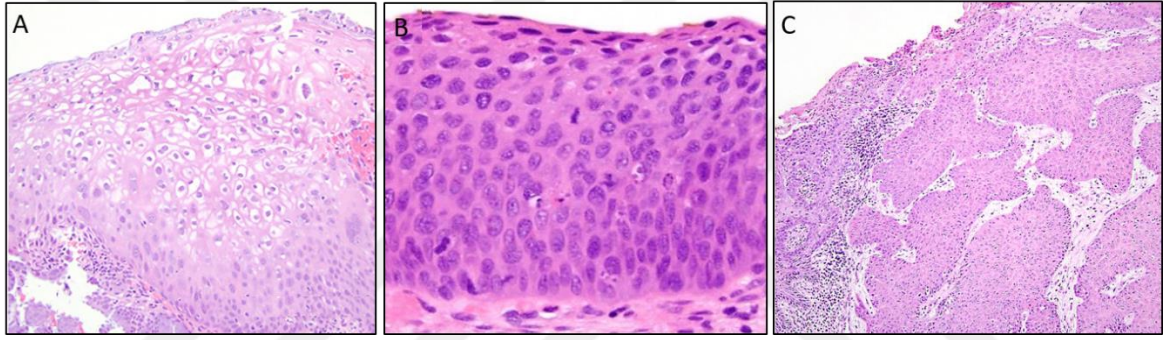
Servikal intraepitelyal lezyonların histopatolojisi değerlendirilirken ise hücrelerdeki nükleer ve sitoplazmik değişikliklerin yanı sıra displazik hücrelerin epitel hücre katmanındaki dağılımı da önem kazanmaktadır.

LSIL epitelin alt 1/3'lük kısmını aşmayan, bazal ve parabazal benzeri hücrelerin proliferasyonu ile karakterizedir. Mitotik aktivite bu bölgede sınırlı olup çoğu LSIL vakasında atipik mitoz izlenmez. Epitelin üst 2/3'lük kısmındaki hücreler farklılaşma gösterir ve büyük sitoplazmaya sahiptirler. Bununla birlikte hücrelerde nükleer büyüme nedeni ile nükleus/sitoplazma oranı artmış olarak görülmektedir. Nükleer hiperkromazi, nükleer membran düzensizlikleri, binükleasyon ya da multinükleasyon ve nükleus etrafında perinükleer koilos varlığı izlenebilmektedir. Çoğu LSIL'da koilositoz görülmekle birlikte bu değişiklikler epitelin üst 1/3'lük kısmında bulunur. LSIL olgularının yaklaşık 1/3'ünde bazal ve parabazal tabakasında diffüz p16 boyanması saptanmaktadır (Şekil 2.6.A.).

HSIL metaplazi alanlarında veya skuamozkolumnar bileşke çevresinde, skuamoz hücrelerin anormal nükleer değişikliklerle birlikte sitoplazmik farklılaşma kaybı ile karakterli proliferasyonudur. Nükleer boyutta artışla birlikte nükleus sitoplazma oranında artma, nükleer membran düzensizliği ve artmış mitotik aktivite izlenir. Proliferasyon gösteren hücreler epitelin orta 1/3'ünü aşmış ve yüzeye kadar ulaşmış olabilir. Mitotik figürler epitelin yüzeyini de etkileyecek şekilde tüm katmanlarda görülebilir. Atipik mitozlar sıklıkla

mevcuttur. İmmünohistokimyasal boyamalar ile p16 pozitifliği HSIL ile immatür skuamoz metaplazi ve atrofi ayırımında yardımcı olmaktadır. Ancak pratik kullanımda p16 pozitifliği LSIL ve HSIL olgularının ayırımında kullanılamamaktadır (Şekil 2.6.B.)

Serviksin skuamoz hücreli karsinomu büyüme paternine, hücre tipine ve diferensiyasyon derecesine göre değişkenlik gösterebilir. SCC'nin non-keratinize ve keratinize olmak üzere 2 farklı alt tipi vardır. İnvaziv tümörün varlığını epitel içinde yerleşim gösteren HSIL durumlarından ayırmak için mutlaka bağ dokunun değerlendirilebilmesi gerekmektedir. Tümör sınıflandırması nükleer pleomorfizm derecesine, çekirdekçik boyutuna, mitotik aktivite sıklığına ve nekroz durumuna göre yapılır. Bu özellikler tümörün kemoterapi ya da radyoterapiye vereceği cevap ve klinik seyir için yol gösterici olmaktadır (Şekil 2.6.C.) (15).



Şekil 2.6. Servikal prekanseröz lezyonlar ve SCC'nin histolojik görünümü A) LSIL; hücrelerde bi/multinükleasyon, irregüler nükleer kontürler, nükleer büyüme ve hiperkromazi ve sitoplazmik açılma ile karakterli koilositik atipi görülmektedir B) HSIL; displastik skuamoz hücreler epitelin tüm katmanlarında bulunmaktadır, koilositik atipi yüzeyel hücre katmanında görülmektedir. C) SCC, non-keratinize tip; malign hücrelerde eozinofilik sitoplazma, belirgin hücre sınırları ve hücresel keratinizasyon, çok sayıda nükleol içeren irregüler, büyümüş nükleus dikkati çekmektedir (15)

## 2.1.5. SERVİKAL KANSER ÖNCÜLLERİNİN ERKEN TANISINDA VE ÖNLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

### 2.1.5.1. Pap Test

1916 yılında George Nicholas Papanicolaou deney hayvanları üzerinde seks kromozomları ile ilgili yaptığı deneyler esnasında hayvanların vajinal sekresyonundan elde ettiği yayma örnekleri incelenerek üreme döngüsü zamanının tahmin edilebileceğini ortaya çıkarmıştır.

1928 yılında ise anormal hücreleri vajinal yayma örneklerinde gözlemlemiştir. 1943 yılında jinekolojik patolog olan Herbert Fredrick Traut ile birlikte menstrual döngü, hormon etkisi ve malignite durumlarında vajinal sitolojide görülen değişikliklerin tariflendiği “Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear (Uterus kanserlerinin vajinal yayma kullanılarak tanınması)” isimli bir kitap yayımlamıştır. Bu bulgular vajinadan alınan normal ve anormal yayma örnekleri ile servikste ki değişikliklerin mikroskop altında incelenerek servikal kanserlerin sınıflandırılabilceğini göstermiştir. Bu gelişmelerin ardından uygulanması kolay ve ucuz bir prosedür olan şimdiki adıyla Pap smear ya da Pap test, hızlıca invaziv servikal kanserin tanınması için altın standart haline gelmiştir. Ancak bu metodun yaygınlaşmasıyla anormal Pap smear sonucuyla biyopsiye giden olgulardaki değişikliklerin invaziv kansere değil pre-invaziv servikal lezyonlara ait olduğu belirlenmiştir ve uzmanlar için hangi değişikliklerin hangi seviyedeki lezyona ait olduğunu belirlemek bir problem haline gelmiştir. 1950’li yıllardan sonra preinvaziv lezyonların geri dönüşümlü olabileceğinin anlaşılması, hastalara lezyon seviyesine göre uygulanacak tedavi yönteminin doğru olarak seçilememesi ve gözlemciler arasındaki fikir farklılıkları bu yöntemin bir tanılama yöntemi değil özellikle prekanseröz lezyonların taranmasında kullanılabilecek bir yöntem olduğunu göstermiştir (16)(17).

1980’li yılların sonuna kadar Pap smear’lerde görülen değişikliklerin raporlanmasında birbirinden farklı terminolojiler kullanılmıştır ve bu durum klinik olarak bir çok karışıklığa sebep olmuştur. 1988 yılının aralık ayında Amerika’nın Bethesda şehrinde konunun uzmanlarının önderliğinde Pap test sonuçlarının raporlanması için standart bir sistem geliştirmek amacıyla bir toplantı düzenlenmiş ve “Bethesda sistemi” adı verilen sınıflandırma prosedürleri ortaya çıkarılmıştır (18). Birkaç yıl içinde yapılan tekrar toplantılarında sistem güncellenmiş ve uluslararası kullanılacak bir terminoloji sistemi haline gelmiştir. Günümüzde uluslararası düzeyde Pap smear’lerde görülen hücresel değişikliklerin sınıflandırılmasında 2014 yılında Bethesda sisteminde yapılan son terminoloji güncellemeleri kullanılmaktadır (19).

Konvansiyonel Pap smear yöntemi özellikle örnekleme ve fiksasyon basamakları sırasında oluşan olumsuzluklar, yaymada kan, mukus, inflamatuvar debrisin hücreleri örtmesi ve kalın yayma nedeniyle yalancı negatif sonuçların ortaya çıkmasına ya da optimal değerlendirme yapılamamasına neden olabilmektedir. Bu aksaklığı gidermek amacıyla 1996 yılında sıvı

bazlı sitoloji (Liquid based cytology=LBC) yöntemi klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Bu prosedürde, fırçayla alınan örnekler özel koruyucu bir solusyona daldırılarak hemen fiks edilmektedir. Ardından sisteme ait cihaz yardımıyla hücreler lama ince bir şekilde yayılarak boyama işlemi yapılmaktadır. Yöntemin kullanılmaya başlanmasından itibaren konvansiyonel ve LBC yöntemlerinin servikal intraepitelyal lezyonların PAP test ile saptanmasında özgünlük ve duyarlılık açısından farklılık gösterip göstermediğini araştırmak amacıyla birçok birçok çalışma yapılmıştır. Çalışmalardan elde edilen bulgular doğrultusunda LBC yönteminin fiksasyon yöntemini stabil hale getirerek, hücrelerin üzerini örten diğer elemanların değerlendirme sırasındaki etkisini azaltarak ve hücrelerin ince bir şekilde yayılmasını sağlayarak konvasiyonel yönteme göre yalancı negatif vakaları azalttığını, SIL'ların saptanmasında özgünlük ve duyarlılığın arttığını, önemi belirlenemeyen atipik skuamoz hücreler (ASCUS) kategorisindeki smear tanısının azaldığını öne sürmüşlerdir. Aynı zamanda gerekli durumlarda hasta ilave bir işleme sokulmaksızın solüsyon içinde kalan hücreler kullanılarak HPV testi, immunohistokimya boyaması vb. tekniklerin uygulanabilmesi yöntemin avantajını arttırmaktadır (20)(21)(22)(23).

Servikal sitoloji taraması servikal kanser görülme ve ölüm oranını önemli ölçü de azaltsa da özellikle HSIL olgularının saptanmasındaki %35-%68'lik sensitivite oranıyla tanılama için hala oldukça sınırlı bir yöntemdir (24). Pap smear sensitivitesinin düşük olması, gözlemciler arasında görülen tanı farklılıkları sebebiyle servikal kanserlerin taranmasında Pap teste ek olarak HPV testi de kullanılmaktadır. Serviks kanseri tarama programında hastanın yaşı, Pap smear yeterliliği ve tanısı, HPV pozitifliği/negatifliği, HPV pozitifliğinde genotipleme sonucu bir arada değerlendirilerek hastanın hangi sıklıkla kontrole gelmesi gerektiği, kolposkopi incelemesi yapıp yapılmayacağı belirlenerek hasta yönetimi sağlanır (25).

#### **2.1.5.2. HPV Testi ve HPV Aşısı**

1970 yılında Almeida ve ark. ilk defa genital siğillerde papilloma virüslerinkine benzer viral partiküllerin bulunduğunu göstermiştir (26). Harald zur Hausen 1977 yılında HPV'lerin skuamoz hücreli karsinomların oluşumunda rolü olabileceğini ortaya koymuş ve ilerleyen yıllarda sırayla genital siğillerde HPV6'nın varlığını daha sonra ise servikal kanser örneklerinde HPV16 ve HPV18 virüslerinin varlığını tanımlamıştır (27)(28)(29)(30). Bu bulgular HPV testi ve aşısının klinik uygulamalarda kullanımı için önemli bir adım olmuştur.

1989'da Tidy ve ark. normal ve displazik hücreler içeren smear'leri olan hastalardan alınan doku örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile HPV16 DNA'sının varlığını göstermişler ve bu tekniğin servikal kanser tarama programında kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (31). Toplanan örneklerde HPV varlığını belirlemek amacıyla kullanılan moleküler yöntemler nükleik asit hibridizasyon analizleri, sinyal amplifikasyon analizleri ve nükleik asit amplifikasyon analizleri olmak üzere 3 ana başlık altında toplanabilir. Nükleik asit hibridizasyon teknikleri Southern Blot, in situ hibridizasyon ve dot-blot hibridizasyon analizleri servikal örneklerdeki HPV'nin belirlenmesinde kullanılabilir. Bu teknikler yüksek kalitede bilgi vermesine rağmen direk uygulanan prob yaklaşımının düşük sensitiviteye sebep olması, yüksek miktarda saflaştırılmış DNA gerekliliği, bazı problemlerin radyoaktif özellikte olması ve işlemlerin uzun sürmesi bu teknikleri dezavantajlı hale getirmektedir. Sinyal amplifikasyon analizleri solüsyon içindeki işaretli RNA problemlerinin hedef HPV DNA'sı ile hibridizasyonuna dayanır. Kullanılan sistemler özellikle servikal sitolojik örneklerde ya da özel solüsyonlarla muamele edilmiş taze örneklerde yüksek riskli HPV'lerin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu sistemler klinikte kullanım için onaylanmış, yanlış pozitiflik oranı düşük ve genotipleme için yüksek duyarlılıkta olmalarına rağmen HPV tiplerini tek tek ayıramamakta, özgül oldukları HPV tiplerinin pozitifliği hakkında bilgi vermektedir. Nükleik asit amplifikasyon analizlerinde ise mikrodizin, PZR, qRT-PCR ve HPV genom dizileme yöntemleri kullanılmaktadır. Genellikle bu yöntemlerde HPV'ye ait E1 geni, L1 kapsit geni, E6/E7 genleri hedeflenerek HPV varlığı belirlenirken tiplendirme analizleri de gerçekleştirilebilmektedir (32)(33).

Diğer yandan servikal prekanseröz lezyonların ve invaziv kanserlerin önlenmesi için kullanılan bir diğer yöntem ise HPV aşısının klinikte kullanımıdır. 1990'ların başında Frazer ve ark. profilaktik aşılarla virüs benzeri partikülleri bloklamak için kullanılacak HPV16 L1 kapsit proteinini üretmek için çalışmalar yapmışlardır (34). Günümüzde kullanılan HPV aşıları da virüsün L1 veya L2 antikorlarına karşı immünite geliştirilmesini amaçlamaktadır. En geniş spektrumlu aşı en yaygın görülen düşük ve yüksek risk gruplarından HPV 6,11,18,16, 31,33 45,52,58 tiplerine karşı üretilmiştir ancak daha yaygın olarak kullanılan aşılarda sadece HPV16, 18 ya da HPV 6,11,16,18'e karşı geliştirilen aşılardır. Aşıların özellikle adolesan dönemindeki kadın ve erkeklerde kullanımı önerilmektedir. Aşı fiyatlarının yüksek olması, kültürel etkiler, sağlık sisteminde yaygın olarak uygulanamaması

ve kısıtlı sayıdaki HPV tipine karşı koruma aşının uygulanabilirliğini ve koruyuculuğunu olumsuz yönde etkilemektedir (35).

Pap test ve HPV test sonuçlarındaki uyumsuzluklar, yanlış negatif olgular, Pap test sonucu benign ancak HPV testi pozitif olan hastaların yönetimindeki zorluklar ve bu durumun gereksiz cerrahi yöntemlerin uygulanmasına yol açması, aşı uygulamasının yaygın olarak kullanılamaması servikal kanser öncüllerinin belirlenebilmesi için yeni moleküler biyobelirteçlerin tanımlanması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

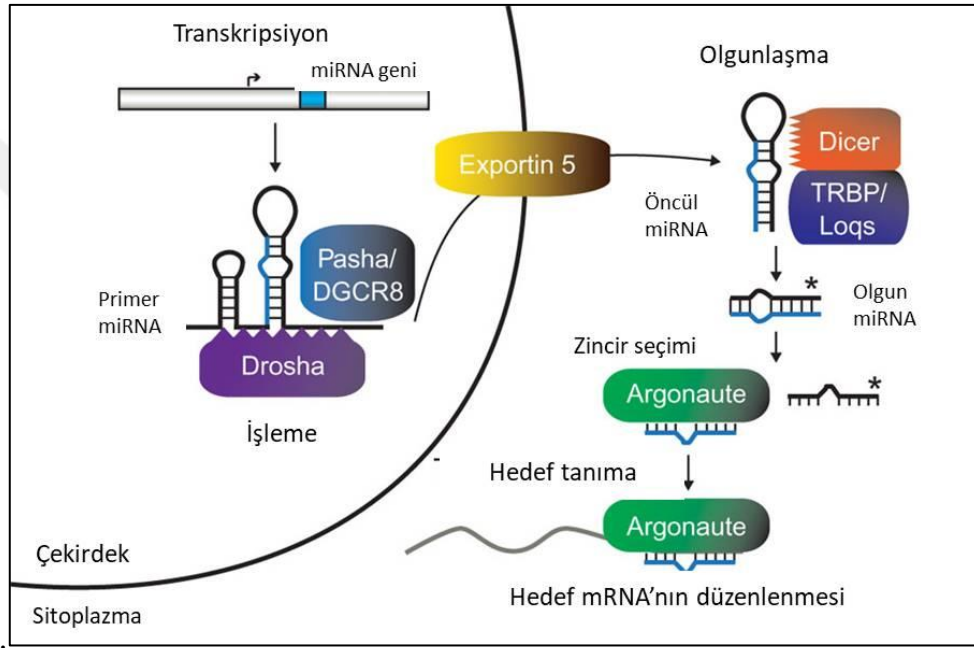
## **2.2. MİKRORNA’LAR**

### **2.2.1. MİKRORNA BİYOGENEZİ**

MikroRNA’lar (miRNA) ilk olarak 1993 yılında *C.elegans*’daki gelişimsel bir defekt iki farklı grup tarafından araştırılırken, lin-4 geninin bir protein yerine bir RNA molekülünü kodladığı ve lin-14 ifadesini baskıladığı bulunarak tanımlanmışlardır (36)(37).

MikroRNA’lar (miRNA) tek zincirli, yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğundaki RNA molekülleridir. Hayvanlarda görülen miRNA’lar genomdan tek başına ya da birkaç taneden yüzlercesini içeren miRNA kümeleri halinde kodlanabilirler. Kümelenmiş miRNA’lar polisistronik transkriptler olarak birlikte sentezlenerek çeşitli kesim işlemlerinden sonra ayrı ayrı olgun miRNA’lara dönüşürler. MiRNA’ların büyük çoğunluğu intronlardan kodlanırken bir kısmı da protein kodlayan ekzonlardan veya intergenik bölgelerden kodlanabilmektedir. miRNA’lar yaygın olarak kanonik miRNA biyogenezi adı verilen mekanizmayla iki aşamada gerçekleşmektedir. miRNA transkripti çekidek içinde RNA polimeraz II enzimi ile öncelikle yaklaşık 70 nükleotid uzunluğundaki saç tokası şeklindeki primer miRNA’ya (pri-miRNA) kodlanır. Pri-miRNA nükleustaki Drosha ve çift zincirli RNA’ya bağlanan bir protein olan “DiGeorge critical region 8 (DGCR8)” in oluşturduğu bir protein kompleksi tarafından kesim işlemine uğrar ve öncül miRNA (pre-miRNA) oluşur. Pre-miRNA taşıyıcı bir reseptör olan Exportin5 tarafından sitoplazmaya taşınır. Daha sonra sitoplazmada Dicer adı verilen bir enzim ve TRBP (trans-activation-responsive RNA-Binding protein) tarafından ikinci bir kesim işlemi geçirir. Bu aşamada saç tokasının başlık kısmı kesilir ve çift zincirli miRNA oluşur. Son olarak Argonaute (AGO) protein ailesinden bir protein olgun miRNA olarak görev yapacak miRNA zincirini seçer ve diğer zincir

degrede olur. AGO proteini ve taşıdığı olgun miRNA RISC kompleksini oluştururlar ve gen susturma görevinde rol oynarlar (Şekil 2.7.). Non-kanonik olarak adlandırılan miRNA biyogenezi ise kanonik biyogenez sırasında kullanılan proteinlerin kombinasyonlarıyla gerçekleşir ve birçok farklı şekilde gerçekleşmesine rağmen genel olarak Drosha/DGCR8-bağımsız ve Dicer-bağımsız olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bu mekanizmalar mRNA kesimi sırasında intronlardan üretilen mirtron adı verilen pre-miRNA'ların, 7-metilgunozin başlıklı pre-miRNA'ların ve endojen shRNA transkriptlerinin işlenerek olgun miRNA haline getirilmesinde kullanılır (38)(39)(40).

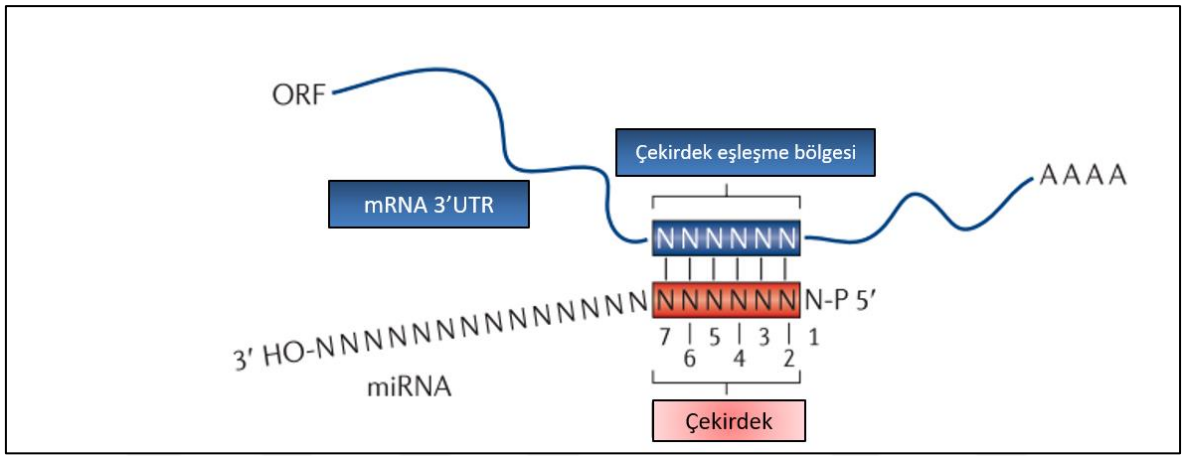


Şekil 2.7. miRNA biyogenezi (41)

## 2.2.2. MİRNA'LARIN ETKİ MEKANİZMASI VE GÖREVLERİ

miRNA'lar gen ifadesinin baskılanmasında rol oynamaktadır. Olgun miRNA içeren RISC kompleksi sayesinde gen ifadesi iki farklı posttranskripsiyonel mekanizma ile düzenlenmektedir. Bunlardan biri hedef mRNA'nın parçalanması diğeri ise translasyon işleminin baskılanmasıdır. Gen susturulmasında hangi mekanizmanın kullanılacağı miRNA ve hedefi arasındaki komplementerlik seviyesine bağlıdır. Ancak hedef mRNA parçalanmasının gen düzenlenmesinde daha yaygın olarak kullanıldığı düşünülmektedir. mRNA'ların miRNA'lara bağlanan bölgeleri genel olarak 3'UTR kısımlarında bulunmaktadır. miRNA'ların 5'uçlarında, 2-7. nükleotidleri arasında hedef tanınmasında

çok önemli rol oynayan “miRNA seed” olarak adlandırılan bölge bulunur (Şekil 2.8.). İnsanlarda protein kodlayan genlerin %60’dan fazlası en az bir adet miRNA bağlanma bölgesi içermektedir ve her miRNA yüzlerce farklı mRNA ifadesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu durum protein kodlayan genlerin miRNA kontrolü altında olduğunu göstermektedir (42). Diğer düzenleme mekanizmasında ise miRNA’lar translasyonu baskılamaktadırlar. Bu mekanizma translasyonu başlangıcında durdurma, translasyonda uzamayı durdurma, ko-translasyonel protein parçalanması ve translasyonun erken aşamada sonlanması şeklinde gerçekleşebilir. Ancak yapılan çalışmalara ait bulgular miRNA’ların translasyonu özellikle başlangıç aşamasında inhibe ettiğini desteklemektedir (43).



Şekil 2.8. miRNA’nın hedef mRNA ile etkileşimi

MiRNA’lar gen düzenleyici rolleriyle birçok farklı sinyal yolağında görev almaktadırlar. Embriyonik gelişimde ve erişkin dönemde kök hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve yenilenmesindeki süreçleri düzenlerler (44). Aynı zamanda yapılan çalışmalar ile miRNA’ların apoptoz, otofaji ve nekrotoz yolakları, hücre döngüsü ve hücrelerin çoğalmasında oynadıkları roller ile viral, immun ve nöro dejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın ve kanserin oluşum ve gelişiminde etkili oldukları gösterilmiştir (45)(46)(47).

### 2.3. SERVİKAL KANSER OLUŞUM VE GELİŞİMİNDE miRNA’LARIN ROLÜ

HPV aşılı, HPV tiplene testleri ve geleneksel Pap Smear tarama testi bir araya getirilerek servikal kanser oluşumu önemli ölçüde azaltılmıştır. Ancak hala dünya çapında kansere bağlı ölümlerin görüldüğü kanserler sıralamasında servikal kanserler dördüncü olarak yer almaktadır. Bu durum bilim insanlarını tanı vermede kullanılacak yeni biyobelirteçler ve

tedaviler bulmaya yöneltmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar miRNA'ların servikal kanser oluşumundan sorumlu birçok önemli genin ifadesini düzenlediğini göstermiştir.

Karsinogenezde rol oynayan miRNA'lar onkojenik miRNA'lar ve tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak sınıflandırılmaktadır. Onkojenik miRNA'lar tümör baskılayıcı genleri inhibe ederek karsinogeneze katkı sağlarken, tümör baskılayıcı miRNA'lar ise kanser oluşumuna karşı proto-onkogenlerin ifadesini inhibe etmektedir. Aynı miRNA farklı tümör tiplerinde onkojenik ya da tümör baskılayıcı olarak görev yapabilmektedir (48). Klinik örnekler ile yapılan mikrodizin ve eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) çalışmalarına ait bulgular miRNA ifadelerinin kanser tiplerine özgün olarak değiştiğini ortaya koymuştur. Normal ve kanserli dokulardaki miRNA ifadeleri karşılaştırıldığında onkojenik miRNA'ların ifadelerinin kansere özgül olarak arttığı, tümör baskılayıcı miRNA'ların ifadesinin ise azaldığı bulunmuştur. Servikal kanserlerde de birçok onkojenik ve tümör baskılayıcı miRNA görev yapmaktadır (49).

Literatüre bakıldığında servikal kanserlerde miRNA ifadelerinin çalışıldığı bir çok araştırma görülmektedir ve farklı araştırmalarda bir çok farklı miRNA üzerinde durulmuştur. 2014 yılında literatürdeki 51 araştırma makalesi derlenerek hazırlanan bir çalışmada normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv servikal kanser durumlarında ifadesi değişen toplam 246 miRNA bulunduğu, bunlardan 41 tanesinin 5 ve daha fazla makalede ortak olarak saptandığı ve 116 tanesinin ise birden fazla makalede tanımlandığı görülmüştür (50). 2015 yılında 27 çalışma verisinin dahil edildiği meta-analiz çalışmasında invaziv kanser durumunda normale göre ifadesi artan 7 tane, ifadesi azalan 3 tane miRNA'nın öne çıktığı saptanmıştır. Aynı zamanda 14 adet metastaz ilişkili miRNA belirlenmiştir (51). Bunlara ek olarak 2018 yılında 2010-2017 yılları arasında yayınlanan 372 çalışma arasından seçilen 24 adet qRT-PCR ve mikrodizin çalışmasına ait sonuçlar ile yapılan derleme çalışmasında ise normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser arasında her aşamada ifadesi artan ve azalan miRNA'lar listelenmiştir (52).

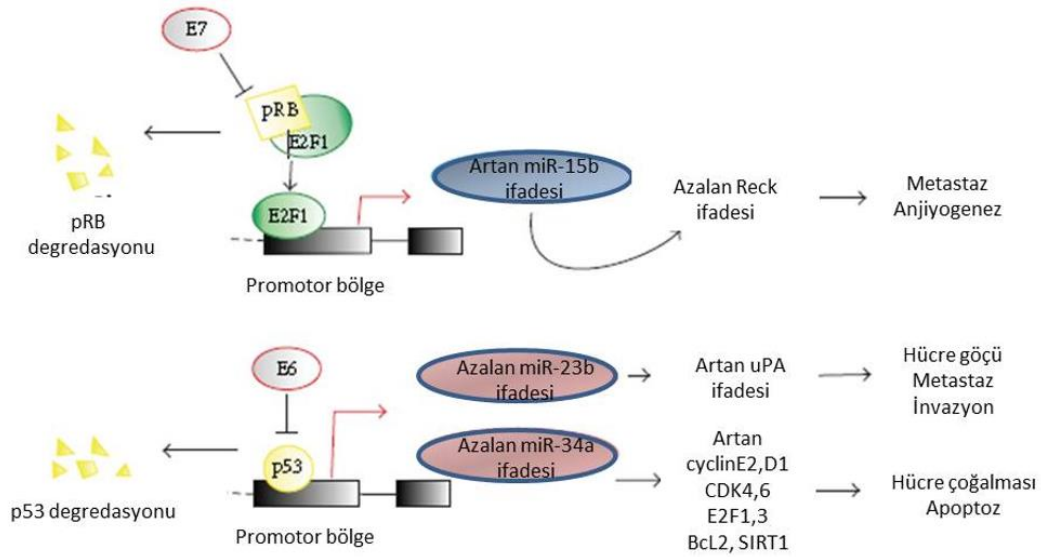
miRNA'ların viral genlerin ifadesinin düzenlenmesinde ve DNA replikasyonunda da önemli görevleri olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Nuovo ve ark. tarafından 2010 yılında yayınlanan bir çalışmada in vitro koşullarda dışarıdan verilen miR-125b'nin HPV16 DNA replikasyonunu baskıladığı görülmüştür (53). 2015 yılında Ribeiro ve ark. tarafından

yapılan bir çalışmada ise miR-125b'nin HPV ile enfekte olmuş normal hücrelerde ifadesinin arttığı ancak pre-kanseröz lezyon oluşmaya başladığında ve artan lezyon derecelerinde ifadesinin azaldığı görülmüştür (54). Bu bilgiler hücrelerin ilk defa HPV ile enfekte olduğunda oluşan immün cevapta miRNA'ların rol oynuyor olabileceğini göstermektedir.

Bunun yanı sıra miRNA'lar tümör baskılayıcı ya da onkojenik özellikleri ile de HPV kaynaklı displazi oluşum sürecinde rol oynamaktadır. miR-34a tümör baskılayıcı bir miRNA'dır. p53 miR-34 için bir transkripsiyon faktörüdür ve miR-34'yı kodlayan genin promotoruna bağlanıp aktive ederek ifadesinin artmasını sağlar. Yüksek riskli HPV enfeksiyonu viral E6 onkoproteini sayesinde p53-bağımlı sinyal yolağını etkileyerek miR-34a ifadesinin azalmasını sağlar. Bu azalma sadece servikal kanserlerde değil prekanseröz lezyonlarda da görülmektedir. Tümör baskılayıcı olan miR-34a ifadesi artan displazi derecelerinde yani LSIL'dan HSIL'a gidildikçe azalma göstermektedir (55).

Urokinaz-tipi plazminojen aktivatör (uPA) miR-23b'nin hedefidir ve direkt olarak servikal kanserlerde hücre migrasyonu ve invazyonu ile ilişkilidir. Yüksek riskli HPV pozitif servikal kanser dokusuna ait hücreler ve hücre hatlarında miR-23b ifadesinin düştüğü görülmüştür. miR-23b ifadesindeki bu düzenlenmenin viral E6 proteininin p53 yolağı üzerinden etkilendiği düşünülmektedir. (56)(57)

HPV E7 proteini ise pRb yolağı üzerinden anjiyogenez ve metastaza neden olmaktadır. Viral E7 pRb'nin parçalanmasına neden olur ve bir transkripsiyon faktörü olan E2F bağlı olduğu pRB-E2F kompleksinden ayrılır. E2F1 ve ECF3, miR-15a, miR15b ve miR-16 ifadelerini pozitif olarak regüle eder. Uterus leiomyomlarına ait materyaller kullanılarak yapılan bir çalışmada miR-15b'nin azalan ifadesiyle anjiyogenezde ekstraselüler matrix oluşumundan ve malign hücrelerin invazyon ve metastatik aktivitelerini düzenlemeden sorumlu olan RECK proteinini hedeflediği ve RECK ifadesini azalttığı bulunmuştur (58). HSIL ve SCC materyalleri kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise özellikle HPV16 pozitifliğinin azalan RECK ifadesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 2.9.) (59).



Şekil 2.9. Viral E6 ve E7 proteinlerinin pRb ve P53 yolları üzerindeki etkisi ve miRNA'ların bu süreçlerdeki rolü (21)

Viral E6 ve E7 genleri sadece p53 ve pRb yolları üzerinden etkili olmayabilirler. miR-21 bir onkogenik miRNA'dır ve hedef proteini tümör baskılayıcı PTEN proteindir. Kong ve arkadaşları tarafından servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, miR-21 ifadesinin HPV E7 proteini tarafından arttırıldığı bulunmuştur (60). Xu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise 28'inde HPV(+) olan 36 invaziv servikal kanser örneğinde miR-21'in ifadesinde aşırı bir artış gözlenirken PTEN ifadesinin azaldığı görülmüştür (61).

Tüm bu bulgular miRNA'ların birçok farklı sinyal yolağı üzerinden HPV'ye karşı oluşturulan immün cevapta, servikal kanserlerin başlangıç, gelişim ve invazyon aşamalarında önemli rolleri olduğunu işaret etmektedir. Literatürde servikal kanserler ve miRNA'lar üzerine yapılan birçok çalışma olmasına rağmen doku örneklerindeki çeşitlilik, doku donörleri arasındaki genetik ve çevresel faktör farklılıkları, klinikopatolojik özellikler ve ifade profilleme profilleri arasındaki değişkenlikler çalışmalarda bulunan biyobelirteçlere ait sonuçlar arasında farklılık yaratabilmektedir (51). Ancak gelişen teknolojiler ve artan çalışmalar ile mevcut servikal kanser tarama sistemlerine ek olarak daha spesifik sonuçlar verecek olan miRNA tabanlı biyobelirteçler ve tedaviler bulunması amaçlanmaktadır.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Günümüzde servikal kanserlerin öncül lezyonlarının taranmasında Pap test ve HPV testi kullanılmaktadır. Ancak Pap smear testinin spesifisite ve sensitivitesinin düşük olması, HPV pozitif hastalarda her zaman lezyon oluşumunun görülmemesi ve böylece bu hastaların yönetiminde zorluklar yaşanarak fazla cerrahi uygulamalara sebebiyet vermesi nedeniyle öncül lezyonların saptanmasında daha özgün biyobelirteçlerin saptanması gerekmektedir.

MiRNA'ların kanser oluşum ve gelişiminde rol aldığının anlaşılması ile birlikte servikal kanserler için tanıda daha spesifik olabilecek miRNA tabanlı biyobelirteçler araştırılmaya başlanmıştır. Literatüre bakıldığında, 2008 yılından günümüze kadar servikal kanserlerde miRNA ifadeleriyle ilgili bir çok araştırma yapıldığı görülmektedir ve bu araştırmalarda farklı skuamöz intraepitelyal lezyon dereceleri ve invaziv karsinom durumlarında ifadesi değişen farklı miRNA'lar üzerinde durulmuştur (52)(62) .

Servikal kanser basamaklarında değişen miRNA seviyelerinin saptanması konusunda yapılan çalışmalarda genel materyal olarak formalin fikse parafine gömülü (FFPE) dokular, frozen kesitler ve hücre kültürlerinin kullanıldığı görülmektedir (52)(63). Bugüne kadar sadece 4 çalışmada servikal sitoloji örneklerinin kullanıldığı görülmektedir ve bunlardan sadece 2018 yılında Kawai ve ark. tarafından yapılan çalışmada mikrodizin ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak lezyon dereceleri arasında değişen miRNA'lar için kapsamlı profili araştırması yapılmıştır (54)(64)(65)(66).

Tez kapsamında öncelikle ANOVA bağımlı-sıralama tabanlı bir meta-analiz çalışması yapılmıştır. Bu analizde farklı çalışmalardaki veriler bir araya getirilerek servikal lezyon dereceleri arasında ifadesi değişen miRNA'lara genel bir bakış açısı sağlanabilmektedir. Meta-analiz çalışmasından elde edilen bulgular servikal kanserlerin oluşum ve gelişiminin aydınlatılması, teşhis ve/veya tedavide kullanılabilecek yeni biyobelirteçler belirlenebilmesi için miRNA'ların potansiyel adaylar olduğuna işaret etmektedir. Daha sonraki biyoinformatik analizlerde yine literatürdeki çalışmalara ait veriler bir araya getirilerek mRNA çalışmaları için karşılaştırma analizleri yapılmış ve buradan elde edilen sonuçlar ile elde edilen meta-miRNA hedefleri karşılaştırılmıştır. İleri aşamalarda ise yolak analizleri ve insan kanser genom atlası (TCGA) verileri ile kullanılarak yapılan analizlerle servikal

kanserde önemli rol oynadığı ön görülen meta-miRNA ve hedefleri seçilerek ileri analizlere geçilmiştir.

Çalışmada ana materyal olarak servikal sitoloji örnekleri ve FFPE doku örnekleri kullanılmıştır. Servikal sitoloji örnekleri bu konuda çalışılan nadir örneklerdir ve invaziv cerrahi yöntemler uygulanmadan lezyonların saptanmasında kullanılabilecek en iyi materyallerdir. Bu ileri analizler kapsamında, meta-analiz ve biyoinformatik analizler sonucunda elde edilen ve en kuvvetli biyobelirteç adayı oldukları saptanan miRNA ve hedef gen ifadelerinin benign ve intraepitelyal lezyonlara ait hücreleri içeren servikal sitoloji örneklerinde nasıl değiştiğinin araştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda sitoloji örneklerinden alınan sonuçlar tanı vermede altın standart olarak kabul edilen FFPE doku örnekleri ile yapılan doğrulama deneylerine ait sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

Bunlara ek olarak biyoinformatik ve bağımsız örnekler ile yapılan doğrulama çalışmalarından sonra öne çıkan miRNA ve mRNA'lar ile hücre kültürü deneyleri yapılarak bu biyomoleküllerin birbiri ile olan ilişkisi, hücre çoğalması ve hareketliliğindeki rolleri de fonksiyonel olarak araştırılmıştır.

Sonuç olarak tüm analizler ve deneyler sonucunda normal serviks hücrelerine göre servikal kanser öncüllerinde ve invaziv kanser durumunda ifadesi değiştiği belirlenen miRNA ve mRNA'lar aday biyobelirteçler olarak literatüre katkı sağlanırken bir yandan da yapılacak olan ileri çalışmalar için zemin hazırlanmıştır. Tüm bulgular sonucunda invaziv kanser ve prekanseröz lezyonların tanınmasına mevcut yöntemlerden daha spesifik potansiyel biyobelirteçler ortaya çıkarılarak bunlara alternatif yaklaşımlar önerilebilmektedir.

## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLERDE KULLANILAN ÇALIŞMALAR

Tez çalışmasının ilk aşamasında serviks kanseri oluşum ve gelişim sürecinde rol oynayan miRNA ve mRNA'ların belirlenebilmesi amacıyla biyoinformatik bir ön çalışma yapılmıştır. Bu aşamada GEO (Gene Expression Omnibus) ve Array Express veri tabanlarından elde edilen miRNA ve mRNA mikrodizin çalışmaları kullanılmıştır.

Serviks kanseri oluşum ve gelişiminde rol alan biyomoleküllerin araştırılması için; toplamda 36 normal, 18 LSIL, 31 HSIL ve 14 SCC örneği içeren 3 tane miRNA ve toplamda 38 normal, 25 LSIL, 61 HSIL ve 56 SCC örneği içeren 2 tane mRNA çalışması seçilmiş ve bu çalışmalara ait veriler ile biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra mRNA çalışmalarından elde edilen ve gruplar arasında ifade farklılığı gösteren genlerin kontrolünün yapılabilmesi için 21 normal ve 33 SCC örneği içeren ayrı bir mRNA çalışması seçilmiştir. Çalışma verilerinin özellikleri Çizelge 4.1.'de detaylı olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Literatür araştırması sonucunda serviks kanseri oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA ve mRNA'ları belirlemek amacıyla seçilen mikrodizin çalışmalarının erişim kodu, veri tipi, örnek sayıları ve platform özellikleri

| GEO /Array Express ID  | Örnek Sayıları |      |      |     | Platform                                                                                       |
|------------------------|----------------|------|------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| miRNA çalışmaları      | Normal         | LSIL | HSIL | SCC |                                                                                                |
| GSE51993               | 7              | 9    | 8    |     | Illumina Human v2 MicroRNA expression beadchip<br>Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip |
| GSE30656               | 10             |      | 18   | 10  | Agilent-016436 Human miRNA Microarray 1.0                                                      |
| GSE19611               | 19             | 9    | 5    | 4   | National DNA microarray facility of University of Aveiro miRNA chip v1.1                       |
| Toplam                 | 36             | 18   | 31   | 14  |                                                                                                |
| mRNA çalışmaları       | Normal         | LSIL | HSIL | SCC |                                                                                                |
| GSE63514               | 24             | 14   | 40   | 28  | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array                                                    |
| GSE27678               | 14             | 11   | 21   | 28  | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array<br>Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array         |
| Toplam                 | 38             | 25   | 61   | 56  |                                                                                                |
| Kontrol mRNA çalışması | Normal         | LSIL | HSIL | SCC |                                                                                                |
| GSE9750                | 21             | 0    | 0    | 33  | Affymetrix Human Genome U133A Array                                                            |

#### **4.1.1.1. miRNA Mikrodizin Verileri**

GSE51993 (67), Mo ve arkadaşları tarafından Illumina Human v2 MicroRNA expression beadchip ve Illumina HumanHT-12 V4.0 expression beadchip platformları kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 7 normal, 9 LSIL, 8 HSIL örneğine ait veriler tez kapsamında tekrar incelenmiştir.

GSE30656 (68), Wilting ve ark. tarafından Agilent-016436 Human miRNA Microarray 1.0 platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 10 normal, 18 HSIL ve 10 SCC örneğine ait veriler tez kapsamında tekrar incelenmiştir.

GSE19611 (69), Pereira ve ark. Tarafından National DNA microarray facility of University of Aveiro miRNA chip v1.1 platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 19 normal, 9 LSIL, 5 HSIL ve 4 SCC örneğine ait veriler tez kapsamında tekrar incelenmiştir.

#### **4.1.1.2. mRNA Mikrodizin Verileri**

GSE63514 (70), den Boon ve ark. tarafından Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platformu kullanılarak elde edilmiş bir mRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 24 normal, 14 LSIL, 40 HSIL ve 28 SCC örneğine ait veriler tez kapsamında tekrar incelenmiştir.

GSE27678 (71), Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array ve Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array platformları kullanılarak elde edilmiş bir mRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 14 normal, 11 LSIL, 21 HSIL ve 28 SCC örneğine ait veriler tez kapsamında tekrar analiz edilmiştir.

GSE9750 (72), Scotto ve ark. tarafından Affymetrix Human Genome U133A Array platformu kullanılarak elde edilmiş bir mRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 21 normal ve 33 SCC örneği tez kapsamında tekrar analiz edilmiş ve diğer çalışmalardan elde edilen veriler için bir kontrol çalışması olarak kullanılmıştır.

#### **4.1.1.3. TCGA (The Cancer Genome Atlas) Verileri**

TCGA analizleri için veri tabanından “TCGA Cervical Cancer (CESC)” veri setine ait bilgiler indirilmiştir. Üç normal ve 306 tümör örneği ile seçilen meta-miRNA’lar ile ifade analizleri yapılmıştır.

#### **4.1.2. DENEYSEL LABORATUVAR ANALİZLERİNDE KULLANILAN NORMAL VE HASTA ÖRNEKLERİ**

##### **4.1.2.1. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örnekleri**

Bu tez çalışmasında Başkent Üniversitesi Hastanesi arşivindeki tanı almış hastalara ait retrospektif ve prospektif olarak seçilen Sıvı-Bazlı servikal sitoloji örnekleri kullanılmıştır. Çalışma kapsamında 22 normal, 23 LSIL ve 20 HSIL örneği ile çalışılmıştır. Analizler sonucunda elde edilecek verilerle birlikte değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilen örneklerin yaş ve HPV bilgileri toplanmıştır (Çizelge 4.2.). Bu çalışma için etik kurul onayı (Ek 1.) ve Sıvı-Bazlı sitoloji örneği kullanılan bireylerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etmek
2. Hastaların hamilelik durumu veya kadın genital sistemine ait herhangi bir başka malignite durumu bulunmaması

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen sıvı-bazlı servikal sitoloji örneklerinin numaraları, yaş ve HPV durumu bilgileri

| Normal Örnekler |     |             |
|-----------------|-----|-------------|
| Örnek No.       | Yaş | HPV Statüsü |
| S_N1            | 36  | HPV (-)     |
| S_N2            | 29  | HPV (-)     |
| S_N3            | 21  | HPV (-)     |
| S_N4            | 24  | HPV (-)     |
| S_N5            | 38  | HPV (-)     |
| S_N6            | 25  | HPV (-)     |
| S_N7            | 50  | HPV (-)     |
| S_N8            | 42  | HPV (-)     |
| S_N9            | 47  | HPV (-)     |
| S_N10           | 39  | HPV (-)     |
| S_N11           | 45  | HPV (-)     |
| S_N12           | 47  | HPV (-)     |
| S_N13           | 47  | HPV (-)     |
| S_N14           | 29  | HPV (-)     |
| S_N15           | 41  | HPV (-)     |
| S_N16           | 28  | HPV (-)     |
| S_N17           | 43  | HPV (-)     |
| S_N18           | 40  | HPV (-)     |
| S_N19           | 28  | HPV (-)     |
| S_N20           | 63  | HPV (-)     |
| S_N21           | 47  | HPV (-)     |
| S_N22           | 45  | HPV (-)     |
| LSIL Örnekleri  |     |             |
| Örnek No.       | Yaş | HPV Statüsü |
| S_L1            | 20  | Bilinmiyor  |
| S_L2            | 50  | HPV66       |
| S_L3            | 46  | HPV33       |
| S_L4            | 61  | Bilinmiyor  |
| S_L5            | 35  | HPV56       |

| S_L6                  | 46         | HPV+               |
|-----------------------|------------|--------------------|
| S_L7                  | 32         | HPV39              |
| S_L8                  | 36         | Bilinmiyor         |
| S_L9                  | 20         | Bilinmiyor         |
| S_L10                 | 31         | Bilinmiyor         |
| S_L11                 | 50         | HPV52              |
| S_L12                 | 37         | Bilinmiyor         |
| S_L13                 | 41         | Bilinmiyor         |
| S_L14                 | 35         | HPV35              |
| S_L15                 | 43         | Bilinmiyor         |
| S_L16                 | 32         | Bilinmiyor         |
| S_L17                 | 30         | HPV16,HPV18        |
| S_L18                 | 24         | HPV66              |
| S_L19                 | 28         | HPV+               |
| S_L20                 | 49         | HPV66              |
| S_L21                 | 33         | Bilinmiyor         |
| S_L21                 | 48         | Bilinmiyor         |
| S_L23                 | 27         | Bilinmiyor         |
| <b>HSIL Örnekleri</b> |            |                    |
| <b>Örnek No.</b>      | <b>Yaş</b> | <b>HPV Statüsü</b> |
| S_H1                  | 38         | HPV6               |
| S_H2                  | 25         | HPV16,HPV31        |
| S_H3                  | 33         | Bilinmiyor         |
| S_H4                  | 33         | HPV16              |
| S_H5                  | 21         | HPV16,HPV31,HPV68  |
| S_H6                  | 34         | Bilinmiyor         |
| S_H7                  | 29         | HPV16,HPV56,HPV59  |
| S_H8                  | 40         | HPV52              |
| S_H9                  | 34         | HPV52              |
| S_H10                 | 37         | Bilinmiyor         |
| S_H11                 | 39         | HPV+               |
| S_H12                 | 24         | Bilinmiyor         |
| S_H13                 | 34         | Bilinmiyor         |

|       |    |                   |
|-------|----|-------------------|
| S_H14 | 27 | HPV+              |
| S_H15 | 37 | HPV16             |
| S_H16 | 39 | HPV16,HPV56,HPV58 |
| S_H17 | 38 | Bilinmiyor        |
| S_H18 | 58 | Bilinmiyor        |
| S_H19 | 47 | Bilinmiyor        |
| S_H20 | 37 | Bilinmiyor        |

#### 4.1.2.2. Formalin İle Fikse Edilmiş Parafine Gömülü (FFPE) Doku Örnekleri

Bu tez çalışmasında Başkent Üniversitesi Hastanesi arşivindeki tanı almış hastalara ait retrospektif ve prospektif olarak seçilen FFPE doku örnekleri kullanılmıştır. Çalışma kapsamında 22 normal, 20 LSIL, 22 HSIL ve 18 SCC örneği ile çalışılmıştır. Analizler sonucunda elde edilecek verilerle birlikte değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilen örneklerin yaş ve HPV bilgileri toplanmıştır (Çizelge 4.3.). Bu çalışma için etik kurul onayı (Ek 1.) ve FFPE kullanılan bireylerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Çalışmaya katılmayı kabul etmek
2. Hastaların hamilelik durumu veya kadın genital sistemine ait herhangi bir başka malignite durumu bulunmaması

Çizelge 4.3. Çalışmaya dahil edilen FFPE örneklerinin numaraları, yaş ve HPV durumu bilgileri

| <b>Normal Örnekler</b> |            |                    |
|------------------------|------------|--------------------|
| <b>Örnek No.</b>       | <b>Yaş</b> | <b>HPV Statüsü</b> |
| N1                     | 42         | Bilinmiyor         |
| N2                     | 35         | HPV -              |
| N3                     | 27         | Bilinmiyor         |
| N4                     | 42         | Bilinmiyor         |
| N5                     | 41         | Bilinmiyor         |
| N6                     | 35         | Bilinmiyor         |
| N7                     | 31         | Bilinmiyor         |
| N8                     | 43         | HPV -              |
| N9                     | 39         | Bilinmiyor         |
| N10                    | 46         | Bilinmiyor         |
| N11                    | 41         | Bilinmiyor         |
| N12                    | 37         | Bilinmiyor         |
| N13                    | 37         | HPV -              |
| N14                    | 37         | Bilinmiyor         |
| N15                    | 37         | Bilinmiyor         |
| N16                    | 31         | HPV+               |
| N17                    | 55         | HPV-               |
| N18                    | 38         | Bilinmiyor         |
| N19                    | 33         | Bilinmiyor         |
| N20                    | 37         | HPV-               |
| N21                    | 39         | Bilinmiyor         |
| N22                    | 72         | HPV-               |
| <b>LSIL Örnekleri</b>  |            |                    |
| <b>Örnek No.</b>       | <b>Yaş</b> | <b>HPV Statüsü</b> |
| L1                     | 42         | HPV+               |
| L2                     | 28         | HPV+               |
| L3                     | 35         | HPV56              |
| L4                     | 37         | HPV16              |
| L5                     | 24         | Bilinmiyor         |

| L6                    | 40         | Bilinmiyor          |
|-----------------------|------------|---------------------|
| L7                    | 50         | Bilinmiyor          |
| L8                    | 45         | HPV66               |
| L9                    | 30         | HPV+                |
| L10                   | 36         | HPV+                |
| L11                   | 23         | HPV+                |
| L12                   | 48         | HPV52               |
| L13                   | 36         | Bilinmiyor          |
| L14                   | 41         | HPV+                |
| L15                   | 30         | HPV+                |
| L16                   | 45         | HPV+                |
| L17                   | 36         | HPV+                |
| L18                   | 36         | HPV62               |
| L19                   | 41         | HPV+                |
| L20                   | 30         | HPV+                |
| <b>HSIL Örnekleri</b> |            |                     |
| <b>Örnek No.</b>      | <b>Yaş</b> | <b>HPV Statüsü</b>  |
| H1                    | 32         | HPV+                |
| H2                    | 37         | Bilinmiyor          |
| H3                    | 32         | HPV16, HPV31        |
| H4                    | 34         | Bilinmiyor          |
| H5                    | 42         | HPV+                |
| H6                    | 53         | HPV16, HPV68        |
| H7                    | 59         | HPV16               |
| H8                    | 36         | HPV31               |
| H9                    | 35         | HPV16               |
| H10                   | 50         | Bilinmiyor          |
| H11                   | 30         | HPV+                |
| H12                   | 31         | Bilinmiyor          |
| H13                   | 43         | HPV+                |
| H14                   | 42         | Bilinmiyor          |
| H15                   | 33         | HPV16, HPV33        |
| H16                   | 29         | HPV16, HPV56, HPV59 |

| H17                  | 38         | HPV16              |
|----------------------|------------|--------------------|
| H18                  | 47         | Bilinmiyor         |
| H19                  | 44         | HPV+               |
| H20                  | 62         | Bilinmiyor         |
| H21                  | 39         | HPV+               |
| H22                  | 32         | HPV-               |
| <b>SCC örnekleri</b> |            |                    |
| <b>Örnek No.</b>     | <b>Yaş</b> | <b>HPV Statüsü</b> |
| S1                   | 41         | Bilinmiyor         |
| S2                   | 59         | Bilinmiyor         |
| S3                   | 71         | Bilinmiyor         |
| S4                   | 56         | Bilinmiyor         |
| S5                   | 54         | Bilinmiyor         |
| S6                   | 41         | Bilinmiyor         |
| S7                   | 58         | Bilinmiyor         |
| S8                   | 32         | Bilinmiyor         |
| S9                   | 44         | Bilinmiyor         |
| S10                  | 37         | Bilinmiyor         |
| S11                  | 37         | Bilinmiyor         |
| S12                  | 70         | Bilinmiyor         |
| S13                  | 66         | Bilinmiyor         |
| S14                  | 53         | Bilinmiyor         |
| S15                  | 57         | Bilinmiyor         |
| S16                  | 58         | Bilinmiyor         |
| S17                  | 67         | Bilinmiyor         |
| S18                  | 44         | Bilinmiyor         |

#### 4.1.3. RNA İZOLASYON KİTLERİ, CDNA SENTEZ REAKSİYONU KİTLERİ, QRT-PCR KİTLERİ VE CİHAZLAR

Sıvı-bazlı servikal sitoloji örneklerinden RNA izolasyonu için miRNeasy Mini Kit (Qiagen, 217004) kullanılmıştır.

FFPE örneklerinden RNA izolasyonu için RNeasy FFPE Kit (Qiagen, 73504) kullanılmıştır.

miRNA’lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır.

mRNA’lardan cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity (Roche, 5081963001) kiti kullanılmıştır.

miRNA deneylerinin qRT-PCR reaksiyonu için miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 218073) kullanılmıştır.

mRNA deneylerinin qRT-PZ reaksiyonu için Fast Start SYBR Green Master (Roche, 12032937001) kiti kullanılmıştır.

#### 4.1.4. PRİMERLER

##### 4.1.4.1. miRNA Primerleri

qRT-PCR analizlerinde kullanılan miRNA primerleri Çizelge 4.4.’de verilmiştir. qRT-PCR deneyleri “Lightcycler 480 (Roche)” cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4. qRT-PCR’de kullanılan miRNA primerlerinin isimleri, MIMAT numarası, Qiagen ürün adı bilgileri ve genomik dizisi

| miRNA       | MIMAT No.    | Qiagen Ürün Adı                    | Dizi                     |
|-------------|--------------|------------------------------------|--------------------------|
| hsa-miR-191 | MIMAT0000440 | Hs_miR-191_1 miScript Primer Assay | 5'CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG |
| hsa-miR-23a | MIMAT0000078 | Hs_miR-23a_2 miScript Primer Assay | 5'AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC  |
| RNU6        |              | Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay | -                        |
| hsa-miR-25  | MIMAT0000081 | Hs_miR-25_1 miScript Primer Assay  | 5'CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA |
| hsa-let-7i  | MIMAT0000415 | Hs_let-7i_1 miScript Primer Assay  | 5'UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU  |
| hsa-miR-26a | MIMAT0000082 | Hs_miR-26a_2 miScript Primer Assay | 5'UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU |
| hsa-miR-29a | MIMAT0000086 | Hs_miR-29a_1 miScript Primer Assay | 5'UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA |
| hsa-let-7d  | MIMAT0000065 | Hs_let-7d_1 miScript Primer Assay  | 5'AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU |

#### 4.1.4.2. mRNA Primerleri

Klasik ve qRT-PCR analizlerinde kullanılan miRNA hedeflerine ait primerler Primer3 (73) programı ile tasarlanmış, biyoinformatik doğrulamaları UCSC In-Silico PCR internet aracı kullanılarak yapılmıştır. Primerlere ait T<sub>m</sub> dereceleri, GC yüzdesi, ürün boyu ve sekans bilgileri Çizelge 4.5.'de listelenmiştir. QRT-PCR deneyleri “Lightcycler 480 (Roche)” cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5. Klasik ve qRT-PCR’de kullanılan mRNA primerlerine ait bilgiler

| No. | Gen    | F/R | Uzunluk (Baz) | T <sub>m</sub> (°C) | GC % | Ürün Boyu | Sekans 5'>3'          |
|-----|--------|-----|---------------|---------------------|------|-----------|-----------------------|
| 1   | CCNA2  | F   | 20            | 59.98               | 45   | 224       | TTATTGCTGGAGCTGCCTTT  |
|     |        | R   | 20            | 59.83               | 60   |           | CTCTGGTGGGTTGAGGAGAG  |
| 2   | KLF4   | F   | 20            | 59.86               | 55   | 170       | ACCCACACAGGTGAGAAACC  |
|     |        | R   | 20            | 60.00               | 55   |           | ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC  |
| 3   | CDC6   | F   | 20            | 60.15               | 50   | 239       | AGTTTGTTTCAGGGGCTTGTC |
|     |        | R   | 20            | 59.99               | 50   |           | CGAGACAGCTTCCTTTTGG   |
| 4   | CA2    | F   | 20            | 59.08               | 50   | 195       | GCCAAGTATGACCCTTCCCT  |
|     |        | R   | 20            | 58.56               | 50   |           | TCCATCAAGTGAACCCAGT   |
| 7   | TUBB2A | F   | 20            | 59.99               | 55   | 226       | TTCCAGCTGACCCACTCTCT  |
|     |        | R   | 20            | 59.96               | 55   |           | ACAGGGCCTCGTTATCAATG  |

#### 4.1.5. HÜCRE KÜLTÜRÜ MALZEMELERİ VE HÜCRE HATLARI

İn vitro deneylerde serviks kanseri hücre hattı olan Hela hücreleri (ATCC® CCL2™) kullanılmıştır. Hücre kültüründe besi yeri olarak DMEM + L-Glutamin + %10FBS + %1Penisilin/ Streptomisin, hücre pasajlama işlemleri sırasında yıkama için 1X PBS (Hyclone, SH30256.01), hücrelerin kaldırılması için Tripsin (Hyclone SH30042.01) kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemleri sırasında DharmaFect -1 Transfection Reagent (Dharmacon, T-2001-03), miR-25-3p inhibitor (Dharmacon, IH-300498-07-0005) ve scrambled inhibitor kontrol miRNA (Dharmacon, IN-001005-01-05) kullanılmıştır.

#### 4.1.6. PROTEİN İZOLASYONU

Transfeksiyon işlemlerinin ardından hücre peletleri toplanmış ve bu peletlerden protein izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon işlemi sırasında Complete Lysis-M (Roche, 4719956001) izolasyon kiti ve örneklerde bulunan protein miktarının ölçümü için Coomassie Plus Bradford

Assay (Thermo Scientific, 23209) kullanılmıştır. Ölçümler Tecan plaka okuma cihazında yapılmıştır.

#### 4.1.7. WESTERN BLOT DENEYLERİ İÇİN KULLANILAN CİHAZLAR VE ANTİKORLAR

Western blot deneylerinde kullanılan tampon çözeltiler aşağıdaki gibidir.

- 5x Running Buffer: 15gr TRIS, 72gr Glycine, 5gr SDS 1 litre distile suda çözülmüştür.
- Wet Transfer Buffer: 6gr TRIS, 28.8gr Glycine, 1ml %10 SDS, 200ml %20'lik metanol karıştırılarak son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- 10x TBS: 12.19gr TRIS-Base, 87.76gr NaCl 1 litre distile suda çözülmüştür ve pH:8'e ayarlanmıştır.
- 1.5M TRIS pH:8.8: 18.165gr TRIS-Base 100ml distile suda çözülmüş ve pH:8.8'e ayarlanmıştır.
- %10 APS: 0.1gr APS 1ml distile suda çözülmüştür.
- Bloklama solüsyonu: 0.5gr süt tozu, 10ml x1 TBS-Tween

Görüntüleme işlemleri sırasında WesternBright Sirius HRP Detection Kit Advansta (K-12043-D10) kullanılmıştır.

Western blot işlemlerinde kullanılan antikorlar Çizelge 4.6.'da listelenmiştir.

Çizelge 4.6. Western Blot işlemlerinde kullanılan antikorlar

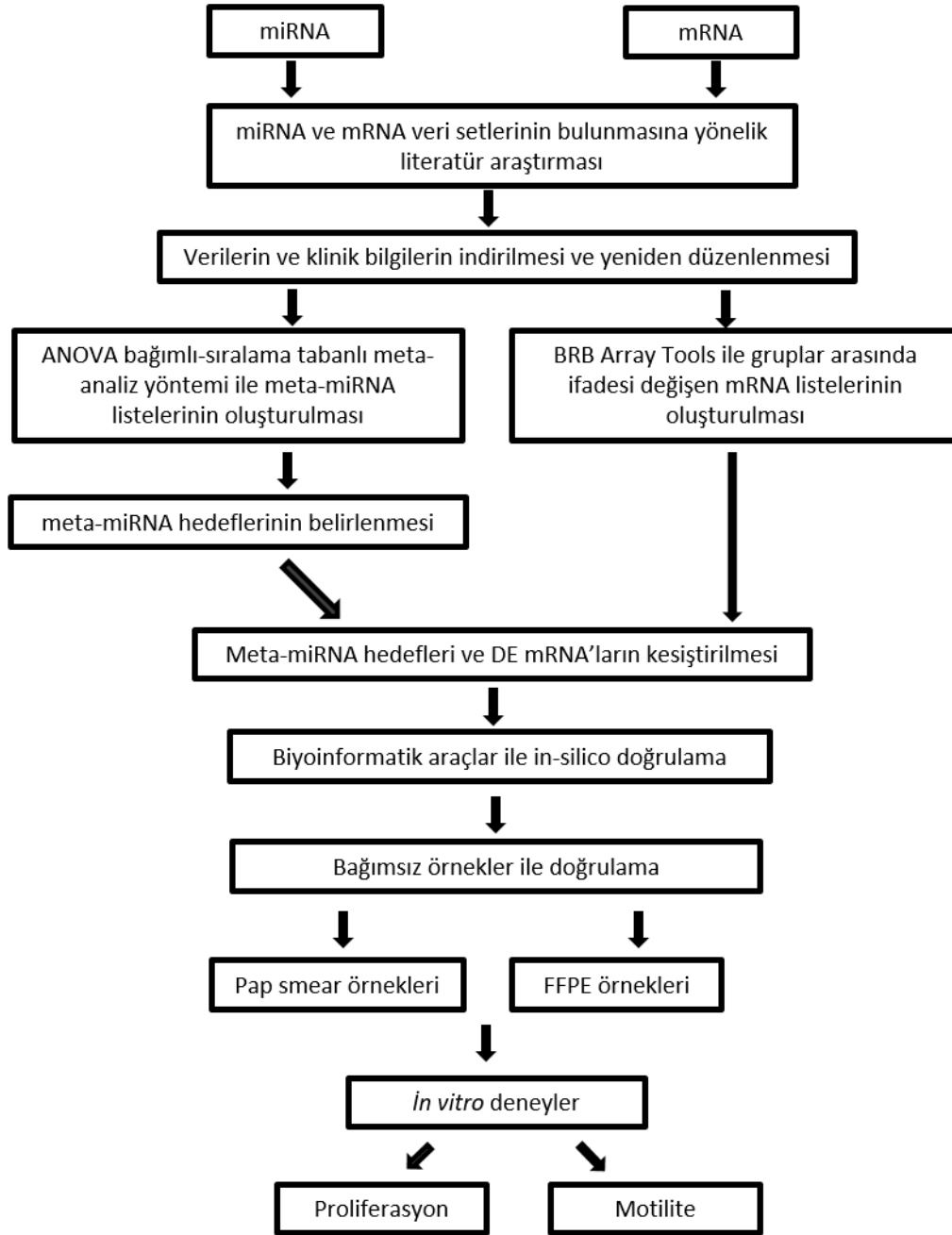
| Antikor Adı                | Marka                | Katalog no | Dilüsyon oranı |
|----------------------------|----------------------|------------|----------------|
| ACTB                       | Biolegend            | 643802     | 1:1000         |
| KLF4                       | St John's Laboratory |            | 1:1000         |
| SNAIL                      | Cell Signaling       | C15D3      | 1:1000         |
| VIMENTIN                   | Cell Signaling       | D21H3      | 1:1000         |
| HRP-conjugated Anti-Mouse  | Biolegend            | 405306     | 1:5000         |
| HRP-conjugated Anti-Rabbit | Cell signaling       | 7074S      | 1:10000        |

#### **4.1.8. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYAMALAR İÇİN KULLANILAN CİHAZLAR, KİTLER VE ANTİKORLAR**

İmmunohistokimyasal (IHK) boyamalar “Omnis,Dako” otomatik boyama cihazında gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemleri sırasında primer antikor olarak KLF4 (Kruppel-like factor 4) antikoru (Rabbit polyclonal antibody, St John’s Laboratory, STJ28723) ve EnVision Flex (Dako, Danimarka) IHK boyama kiti kullanılmıştır. İşlem aşamalarında kullanılan kit içeriğindeki reaktifler aşağıda listelenmiştir.

- Clearify, Dako
- EDTA tampon solüsyonu, EnVFlex HRS,High pH, Dako
- Peroksidaz solüsyonu, EnVFLEX Peroxidase-Blocking Reagent, Dako
- HRP solüsyonu, EnV Flex/HRP solution, Dako
- Kromojen+enzim solüsyonu, EnVFlex Substrate Working Solution, Dako
- Rabbit linker, Dako
- Hematoksilen, Dako

## 4.2. YÖNTEM



Şekil 4.1. İş akış şeması

#### **4.2.1. PREKANSERÖZ LEZYON VE KANSER DURUMUNDA DEĞİŞEN MİRNA VE HEDEF GENLERİN BİYOİNFORMATİK ANALİZİ**

##### **4.2.1.1. Mikrodizin Çalışmalarının Bulunmasına Yönelik Literatür Araştırması**

Biyoinformatik analizler için literatür araştırması kapsamında normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser durumunda ifadesi değişen miRNA ve mRNA'ların belirlenebilmesi amacıyla Gene Expression Omnibus: GEO ve Array Express veri tabanları kullanılarak bu örneklere ait veriler içeren mikrodizin çalışmaları araştırılmıştır (74)(75).

GEO ve Array Express veri tabanlarında mikrodizin verisi aranırken anahtar kelime olarak “cervical cancer”, “cervical intraepithelial neoplasia”, “cervical intraepithelial lesion”, “miRNA”, “mRNA” ve/veya “expression” ifadeleri kullanılmıştır. Lezyon derecelerindeki değişimlerin belirlenebilmesi amacıyla tez kapsamına dahil edilen çalışmaların olabildiğince tüm kategorilere (normal, LSIL, HSIL ve SCC) ait veri içermesine dikkat edilmiştir. Bu çalışmalarda frozen doku, FFPE ve primer doku örneklerinin kullanıldığı çalışmalar dahil edilmiştir.

##### **4.2.1.2. Meta-Analiz**

Gruplar arasında farklılık gösteren miRNA'ları belirlemek amacıyla, çalışmaya dahil edilen miRNA mikrodizin çalışmalarının verileri kullanılarak daha önce laboratuvarımızda geliştirilen ANOVA temelli ve sıralama tabanlı bir meta analiz çalışması yapılmıştır (76). Bu analizde, örnekler öncelikle histolojik tanılarına göre gruplandırılmıştır. Ardından miRNA'lar istatistiksel anlamlılıklarına göre değil tüm çalışmalardaki ortalama değerlerinin sıralamasına göre listelenmiştir. Analiz sonucunda gruplar arasında ifadesi değişen (DE=Differentially expressed) miRNA'lar elde edilmiş ve bu miRNA'lar meta-miRNA olarak adlandırılmışlardır.

##### **4.2.1.3. Mikrodizin Veri Analizi**

Biyoinformatik analizlerin bu basamağında, mRNA çalışmalarına ait mikrodizin veri analizleri (normalizasyon işlemi ve istatistiksel analizler) BRB-ArrayTools programının 4.4.1 (stable) versiyonu kullanılarak yapılmıştır. Bu program “R” yazılım dilinde

“Bioconductor” paketini kullanarak ve bir “Microsoft Excel” eklentisi olarak mikrodizin veri analizi yapılmasına olanak sağlamaktadır.

İlk aşamada, mikrodizin çalışmalarındaki verilerin ham halleri çalışmaya alınmış ve teknik farklılıklardan dolayı ortaya çıkabilecek farklılıkları ortadan kaldırılarak gerçek farklılıkların ortaya çıkmasını sağlamak amacıyla normalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için verileri bir bütün olarak kabul eden ve sayısal değerler yerine sıralama değerlerinin farklı örneklerdeki ortalamasını kullanıp bir sayı değeri vererek işlem yapan “Quantile normalizasyon” yöntemi kullanılmıştır (77).

Veriler normalize edildikten sonra örnekler normal, LSIL, HSIL ve SCC olarak 4 gruba ayrılıp etiketlenmiş ve bu örneklerdeki ifade değerleri BRB-ArrayTools programındaki sınıf karşılaştırması (Class Comparison) komutu ile karşılaştırılmıştır. Bu şekilde normal örneklerle diğer gruplarda en az 2 kat değişim gösteren ve  $p \leq 0.05$  olan mRNA’lar belirlenmiş ve listelenmiştir.

#### **4.2.1.4. Meta-miRNA’lar ve Hedef mRNA İlişkilerinin Elde Edilmesi**

miRNA ve hedef mRNA’ların belirlenebilmesi için aşağıdaki basamaklar gerçekleştirilmiştir.

1. Meta-analiz çalışması sonrasında sıralamadaki ilk 10 DE miRNA çalışma kapsamına alınmıştır. mirDB ve miRWalk 2.0 veri tabanları (Şekil 4.2.) kullanılarak bu miRNA’ların her biri için doğrulanmış mRNA hedef listeleri elde edilmiştir. Her bir veri tabanı için miRNA hedefleri bir araya toplanarak tek bir ortak hedef listesi belirlenmiştir.

2. BRB-ArrayTools kullanılarak ve 2 mRNA mikrodizin çalışmasına ait verilerden normal örneklerle göre farklılık gösterdiği belirlenen mRNA’lar normal/LSIL, normal/HSIL ve normal/SCC başlıkları altında birleştirilmiştir. mirDB ve miRWalk veri tabanlarından elde edilen miRNA hedef listeleri ile bu 3 kategoriye ait listeler karşılaştırılmış ve ortak olan mRNA’lar belirlenmiştir.

3. Ortak olan mRNA’ların bu çalışma verilerinde LSIL, HSIL ve SCC durumlarında normale göre hangi yönde (artma/azalma) değişim gösterdiği belirlenmiştir.

**miRDB**

Choose one of the following search options:

**Search by miRNA name**

Human  Go Clear

**Search by gene target**

Human  Gene Symbol  Go Clear

miRDB is an online database for miRNA target prediction and functional annotations. All the targets in miRDB were predicted by a bioinformatics tool, MirTarget, which was developed by analyzing thousands of miRNA-target interactions from high-throughput sequencing experiments. Common features associated with miRNA binding and target downregulation have been identified and used to predict miRNA targets with machine learning methods. miRDB hosts predicted miRNA targets in five species: human, mouse, rat, dog and chicken. Users may also provide their own sequences for custom target prediction using the updated prediction algorithm. In addition, through combined computational analyses and literature mining, functionally active miRNAs in humans and mice were identified. These miRNAs, as well as associated functional annotations, are presented in the FuncMir Collection in miRDB. As a recent update, miRDB presents the expression profiles of hundreds of cell lines and the user may limit their search for miRNA targets that are expressed in a cell line of interest. To facilitate the prediction of miRNA functions, miRDB presents a new web interface for integrative analysis of target prediction and Gene Ontology data.

References:

**miRWalk 2.0:** a comprehensive atlas of predicted and validated miRNA-target interactions

Predicted Target Module Validated Target Module Documentation Disclaimer Contact Statistics

**Validated information on microRNA targets**

**Step 1: Select a species, database and input identifier type**

Human  Select database  select here

Paste identifiers  MIID, MIMATid, or miRNA

Upload a file  Dosya Seç Dosya seçilmedi  Example file

**Step 2: Result tables i.e. information on pre-miRNA, miRNA, miRNAfamily, host gene, etc.**

miRNA information ☒ miRNA ☐ Similar miRNA ☒ Similar seeds ☒ miR family ☒ Alignment ☒ Host gene ☐ Identifiers

pre-miRNA information ☐ pre-miRNA ☐ Stem-loop structure ☒ Family alignment ☐ Identity

**Step 3: Output**

Query output  SEARCH

Şekil 4.2. Meta-miRNA hedeflerinin belirlenebilmesi amacıyla kullanılan internet araçları

#### 4.2.1.5. miRNA Hedeflerine Göre Yolak Analizi

meta-miRNA'lara ait mRNA hedeflerinin hangi sinyal yollarında rol oynadığını belirlemek ve miRNA'lar arasında hiyerarşik kümeleme analizlerini gerçekleştirebilmek amacıyla DIANA-mirPath tool internet aracı kullanılmıştır (78). Buna ek olarak hedef genlerin özellikle hangi sinyal yollarında zenginleştiğini belirlemek amacıyla WebGestalt (79) internet aracı kullanılmıştır.

#### 4.2.1.6. TCGA Veri Analizleri

Yolak analizleri sonrasında ileri analizler ile araştırılması planlanan miRNA ve hedefledikleri mRNA'ların TCGA verilerindeki ifade değişikliklerini araştırmak amacıyla "Xena Browser" uygulama aracı kullanılmıştır. Üç normal ve 306 tümör örneği içeren "TCGA Cervical Cancer (CESC)" veri seti seçilip ilgili miRNA'lar ve mRNA'lara ait ifade

değerlerini içeren klasör indirilmiştir. Daha sonra yapılan istatistiksel analizler ile miRNA ve mRNA'ların normal ve tümör grupları arasındaki değişimlerine ait bilgiler elde edilmiştir. Buradan elde edilen bulgular önceki bulgular ile karşılaştırılmıştır (80).

#### **4.2.1.7. Kümeleme Analizi**

Tüm biyoinformatik analizler sonucunda, bağımsız örneklerde ifade analizi yapılması planlanan miRNA hedefleri ile kontrol çalışması olarak belirlenen GSE9750 numaralı mikrodizin çalışmasında ait veriler kullanılarak kümeleme analizi yapılmıştır. Bu analizde örnekler ve genler hiyerarşik olarak “Average linkage” metodu ile kümelenmiştir. Analiz için BRB ArrayTools, Cluster 3.0 (81) ve kümeleme analizi sonucunun görüntülenmesinde Java TreeView (82) programları kullanılmıştır.

### **4.2.2. BİYOİNFORMATİK ARAÇLAR İLE NORMAL, PREKANSERÖZ LEZYON VE İNVAZİV KANSER DURUMUNDA DEĞİŞTİĞİ ÖNGÖRÜLEN MİRNA VE MRNA’LARIN SIVI-BAZLI SİTOLOJİ ÖRNEKLERİ VE FFPE DOKU ÖRNEKLERİ KULLANILARAK DOĞRULANMASI**

#### **4.2.2.1. Normal, LSIL ve HSIL Tanısı Almış Bireylere Ait Sıvı-Bazlı Servikal Sitoloji Örneklerinin Seçimi ve Uygulanacak İşlemler İçin Hazırlanması**

Başkent Üniversitesi Patoloji bölümüne gelen sıvı-bazlı servikal sitoloji örnekleri rutin işlemler gereğince Papanicolaou boyama yöntemine göre boyanmış ve mikroskop altında incelenerek BETHESDA tanı kriterlerine göre tanı verilmiştir. Normal, LSIL ve HSIL olarak tanı alan örneklerle ait artan materyaller RNA izolasyonu işlemine kadar +4°C’lik dolaplarda saklanmıştır. Ayrılan bu örneklerden çalışmaya dahil edilecek olanlar seçilirken yaymalar tekrar incelenmiş ve şu kurallara dikkat edilmiştir:

1. Çalışmaya dahil edilen yaymalarda herhangi bir enfeksiyon ajanına ait bulgu saptanmaması
2. Normal örneklerin alındığı hastalarda HPV öyküsü olmaması ve yaymalarda displazi ya da maligniteyi düşündürecek şüpheli herhangi bir hücre görülmemesi
3. LSIL kategorisindeki örneklerle ait yaymalarda daha ileri bir displazi ya da maligniteyi düşündürecek şüpheli herhangi bir hücre görülmemesi

4. HSIL kategorisindeki örnekler ait yaymalarda daha ileri bir maligniteyi düşündürecek şüpheli herhangi bir hücre görülmemesi
5. LSIL ve HSIL kategorisine ait hücrelerin yaymada oldukça yaygın bulunması

#### **4.2.2.2. Normal, LSIL, HSIL ve SCC Tanısı Almış Bireylere Ait FFPE Doku Örneklerinin Seçimi ve Uygulanacak İşlemler İçin Hazırlanması**

Başkent Üniversitesi Patoloji bölümüne gelen FFPE örnekleri rutin işlemler gereğince Hematoksilen&Eosin boyaması ile boyanmış ve mikroskop altında incelenerek tanı verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- Çalışmaya katılmayı kabul etmek
- Normal örnekler ait dokularda displazi ya da maligniteyi düşündürecek şüpheli herhangi bir lezyon alanı görülmemesi
- LSIL kategorisindeki örnekler ait dokularda daha ileri bir displazi ya da maligniteyi düşündürecek şüpheli bir lezyon alanı görülmemesi
- HSIL kategorisindeki örnekler ait dokularda daha ileri bir maligniteyi düşündürecek şüpheli bir lezyon alanı görülmemesi
- Lezyon içeren alanların koterizasyon artefaktı içermemesi
- Lezyon içeren alanın en az 2mm'lik punch biyopsi iğnesi ile çıkarılabilecek büyüklükte olması
- Hastaların hamilelik durumu veya kadın genital sistemine ait herhangi bir başka displazi ya da malignite durumu bulunmaması

Hastane veri sisteminden displazi ve malignite kategorilerine göre liste oluşturulmuş ve öncelikle hastalara ait lamalar arşivden çıkarılmıştır. Daha sonra hastaya ait tüm lamalar ayrı ayrı incelenmiş, normal örnekler için sadece benign epitel hücreleri içeren alanlar, diğer kategoriler için dokulardaki lezyon içeren bölgeler belirlenmiş ve lam üzerinde işaretlenmiştir. Çalışmaya dahil edilecek örneklerdeki lezyon alanlarının en az 2mm'lik punch biyopsi iğnesi ile çıkarılabilecek büyüklükte olmasına ve bu bölgelerin koterizasyon artefaktı içermemesine dikkat edilmiştir. İkinci aşamada seçilen lamlara ait parafin bloklar arşivden çıkarılmış ve lam üzerinde işaretlenmiş lezyon alanlarının blok üzerinde nereye

denk geldiği saptanmış ve aynı şekilde lezyonlu bölge işaretlenmiştir. İşaretlenmiş alanların büyüklüğüne uygun punch biyopsi iğnesi seçilmiş (2mm ya da 5mm) ve bu iğne yardımıyla lezyonlu bölge parafin bloktan çıkarılmıştır. Çıkarılan parafinli doku bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve etiketlenmiş 2ml'lik ependorflara alınmıştır.

#### **4.2.2.3. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi**

Sıvı-bazlı sitoloji örnekleri öncelikle içinde bulundukları Thinprep solüsyonlarına ait kaplardan etiketlenmiş 15ml'lik falkon tüplerine alınmıştır. Ardından 2000rpm'de 5dk santrifüj işlemi uygulanmış ve hücre peleti elde edilmiştir. Peletin üzerindeki supernatan dikkatlice dökülmüş ve sadece peletin kalması sağlanmıştır. Daha sonra RNA izolasyonu için "The miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)" kullanılmış ve kitin yönergelerine uygun biçimde prosedür gerçekleştirilmiştir.

1. Falkonda bulunan peletlerin üzerine 700µl Qiazol Lizis solüsyonu eklendi ve ependorflara alındı.
2. Pelet+Qiazol karışımı 5ml'lik şırıngadan geçirilerek hücrelerin patlatılması sağlandı.
3. Üzerine 140µl Chloroform eklendi ve hızlıca çalkalandı. 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15 dk +4°C'de 12000x g de santrifüj yapıldı.
4. Fazlara ayrılmış örneğin en üstündeki berrak faz yeni ependorfa alındı ve üzerine 520µl etanol eklendi.
5. 700µl etanol+örnek karışımı kolona yüklendi. Quick spin'de 15sn çevrildi. Kolonun altında toplanan atık kısım atıldı. Kalan örnekler bitinceye kadar bu işlem tekrar edildi.
6. Kolonun üzerine 700µl RWT solüsyonu eklendi ve 15sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Altta toplanan atık sıvı atıldı.
7. Kolonun üzerine 500µl RPE solüsyonu eklendi ve 15sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Altta toplanan atık sıvı atıldı.
8. Bir önceki basamak tekrar edildi ve kolonun üzerine 500µl RPE solüsyonu eklendi ve 15sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Altta toplanan atık sıvı atıldı.
9. Kolonlar boş olarak 9000xg'de santrifüj edilerek kalan tüm atık solüsyonların uzaklaştırılması sağlandı.

10. Kolon yeni bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 40µl RNase-free su eklendi. 1 dakika 10000xg'de santrifüj yapıldı.
11. Kolonun altında kalan suda çözünmüş RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) spektrofotometre ile ölçüldü.
12. Kolon 2.kez tekrar 40 µl su ile yıkandı ve elde edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ 1000 ile ölçüldü ve 2.elüsyon olarak kaydedildi.
13. RNA örnekleri -80°C'lik dolaba kaldırıldı.

#### 4.2.2.4. FFPE Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu ve Miktarının Belirlenmesi

Daha önce sonraki işlemler için hazırlanmış olan FFPE dokulardan RNA izolasyonu için "The RNeasy FFPE Kit (QIAGEN)" kiti kullanılmıştır. Kit yönergesine uygun olarak yapılan denemeler sonucunda elde edilen RNA miktar ve kalitesinin uygun olmadığı saptanmış yeni yapılan protokol denemeleri sonucunda optimal yönerge belirlenmiştir.

1. İçerisinde FFPE doku örneği bulunan 2ml'lik ependorfların içine 500µl ksilen eklendi. 58°C'ye ayarlanmış ısı bloğuna koyuldu ve 15dk inkübe edildi.
2. Isınan doku vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30sn Quick spin'de santrifüj yapıldı.
3. Üzerine 500µl etanol eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Peletin üzerinde kalan ksilen-etanol karışımı döküldü.
4. Peletin üzerine 1ml etanol eklendi. Vorteks yapıldı.
5. 13500rpm'de 5dk santrifüj yapıldı.
6. Peletin üzerinde kalan alkol döküldü. Tüplerin ağızları açılarak kalan alkolün uçması beklendi.
7. Peletin üzerine 200µl PKD tamponu eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10000 rpm'de 2dk santrifüj yapıldı.
8. Peletin tam üzerine denk gelecek şekilde 10µl Proteinaz K eklendi. Al-ver işlemi ile karıştırma yapıldı.
9. 56°C'de 1saat ve ardından 80°C'de 15dk inkübe edildi. İnkübasyonlar sırasında her 10dk'da bir vorteks ile karıştırma işlemi yapıldı.
10. İnkübasyonun ardından tüpün en üstünde kalan şeffaf kısım 1.5ml'lik yeni tüpe alındı ve buz üzerinde 3dk bekletildi.
11. 13500rpm'de 5dk santrifüj yapıldı. Supernatan yeni 1.5ml'lik tüpe alındı.

12. Supernatanın üstüne 20µl DNase Booster tamponu ve 10µl DNase I stok solüsyonu eklendi. Karışım pipetaj yapılarak karıştırıldı. 15dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
13. Karışıma 400µl RBC tamponu eklendi ve karıştırıldı.
14. Üzerine 1500µl etanol eklendi. Pipetaj yaparak karıştırıldı.
15. 700µl örnek karışımı kolondan geçirildi. 30sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Kolonun altında toplanan sıvı atıldı. Örnek bitene kadar bu işlem tekrar edildi.
16. 500µl RPE tamponu kolona eklendi. 30sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Kolonun altında toplanan sıvı atıldı.
17. 500µl RPE tamponu kolona eklendi. 30sn Quick spin'de santrifüj yapıldı. Kolonun altında toplanan sıvı atıldı.
18. Kolon yeni bir toplama tüpüne alındı. Kolonun ağzı açık bırakılarak 5dk 1500rpm'de santrifüj yapıldı.
19. Kolonun altına yeni 1.5ml'lik ependorf koyuldu ve üzerine 22µl RNase free su eklendi. 15000rpm'de 1dk santrifüj yapıldı.
20. Kolonun altında kalan suda çözünmüş RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) spektrofotometre ile ölçüldü. RNA örnekleri -80°C'lik dolaba kaldırıldı.

#### **4.2.2.5. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örnekleri ve FFPE Doku Örneklerine Ait RNA'lar ile Mirna Çalışmaları İçin cDNA Sentezi**

RNA izolasyonu sonrasında elde edilen total RNA'dan miRNA'lara ait cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır. Kit içeriğindeki "Universal Tag" kullanılarak miRNA'ların 3' uçlarına Poly A kuyruğu içeren bir dizi takıldı ve PZR işlemi için uygun uzunluğa getirildi. cDNA sentezinde her örneğe ait total RNA'dan hem sitoloji örnekleri için hem de FFPE doku örnekleri için 300ng'a eşit olacak miktarda RNA kullanılmış ve işlemlere bu şekilde devam edilmiştir. cDNA sentezinde aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. Her örnekten 300ng RNA içerecek şekilde RNA kullanıldı ve üzerine RNase-free su eklenerek 12µl'ye tamamlandı.

2. Her örnek için 4µl 5xmiScript HiSpec Buffer, 2µl 10xmiScript Nucleic Mix ve 2µl miScript Reverse Transcriptase Mix kullanılarak örnek sayısına göre reaksiyon karışımı hazırlandı.
3. Örnek+su karışımına 8µl reaksiyon karışımı eklendi ve 20µl toplam hacim elde edildi.
4. Örnek içeren karışımlar önce 60 dakika 37°C'de inkübe edildi daha sonra da reaksiyonu durdurmak amacıyla 95°C'de 5 dakika bekletildi.
5. Sentezlenen cDNA'lar bir sonraki işleme kadar -20°C'lik dolaba kaldırıldı.

#### **4.2.2.6. Sıvı-Bazlı Sitoloji Örnekleri ve Ffpe Doku Örneklerine Ait RNA'lar ile mRNA Çalışmaları İçin cDNA Sentezi**

RNA izolasyonu sonrasında elde edilen total RNA'dan mRNA'lara ait cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) kullanılmıştır. Daha önce yapılan deneme deneyleri sonucunda hem sitoloji örneklerine hem de FFPE doku örneklerine ait RNA'ların oldukça fragmente olduğu saptandığı için cDNA sentezi sırasında Random Hexamer Primer kullanılarak işlem yapılmıştır. cDNA sentezi sırasında sitoloji örnekleri için total RNA'dan 300ng'a, FFPE doku örneklerinden 500ng'a eşit olacak miktarda RNA kullanılmış ve işlemlere bu şekilde devam edilmiştir. cDNA sentezinde aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

1. Sitoloji örneklerinin her birinden 300ng, FFPE örneklerinin her birinden 500ng'a eşit olacak miktarda RNA kullanıldı ve üzerine RNase-free su eklenerek 9.4µl'ye tamamlandı.
2. Örnek+su karışımına Random Hexamer primer eklenerek karışım 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu sayede RNA'ların sekonder yapılarının açılması sağlandı.
3. Her örnek için 4µl 5xTranscriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0.5µl Protector RNase Inhibitor (40 U/ml), 2µl Deoxynucleotide Mix (10mM), 1µl DTT ve 1.1µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase kullanılarak örnek sayısına göre reaksiyon karışımı hazırlandı.
4. Örnek+su+Random Hexamer primer karışımına 8.6µl reaksiyon karışımı eklendi ve 20µl toplam hacim elde edildi.

5. Örnek içeren karışımlar önce 10 dakika 29<sup>0</sup>C’de daha sonra 60 dakika 48<sup>0</sup>C’de inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 85<sup>0</sup>C’de 5 dakika bekletildi.
6. Sentezlenen cDNA’lar bir sonraki işleme kadar -20<sup>0</sup>C’lik dolaba kaldırıldı.

#### 4.2.2.7. Sitoloji ve FFPE Örneklerine Ait mRNA’lar Klasik PZR Yöntemi ile Kontrolü

Sitoloji örnekleri için normal, LSIL ve HSIL, FFPE örnekleri için normal, LSIL, HSIL ve SCC kategorilerine ait mRNA çalışmaları için sentezlenen cDNA’lar GAPDH primeri kullanılarak klasik PZR yöntemi ile kontrol edildi. PCR deneylerinde her örnek için aşağıdaki reaktifler ve miktarlar kullanılmıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Klasik PZR yönteminde kullanılan reaktifler ve miktarları

| Reaktif           | Hacim (µL) / Reaksiyon |
|-------------------|------------------------|
| 10X Buffer        | 2.5                    |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.5                    |
| dNTP              | 0.5                    |
| Taq Polimeraz     | 0.2                    |
| H <sub>2</sub> O  | 15.3                   |
| FP                | 1.0                    |
| RP                | 1.0                    |
| cDNA              | 3.0                    |
| Toplam            | 25.0                   |

#### 4.2.2.8. Sitoloji ve FFPE Örneklerinde miRNA İfadelerinin qRT-PCR Yöntemi ile Doğrulanması

Sitoloji ve FFPE örneklerine ait cDNA’lar ile miScript SYBR Green PCR kit ve Çizelge 4.4.’de yer alan primerler kullanılarak Çizelge 4.8.’deki miktarlara uygun şekilde qRT-PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.8. qRT-PCR yönteminde kullanılan reaktifler ve miktarları

| Reaktif          | Hacim (µL) / Reaksiyon |
|------------------|------------------------|
| SYBR Green Mix   | 5.0                    |
| 10X UP           | 1.0                    |
| 10X Primer Assay | 1.0                    |
| H <sub>2</sub> O | 2.0                    |
| cDNA (5 ng/µL)   | 1.0                    |
| Toplam           | 10.0                   |

#### 4.2.2.9. Sitoloji Örneklerinde mRNA İfadelerinin qRT-PCR Yöntemi ile Doğrulanması

Sitoloji örneklerine ait cDNA'lar ile Fast Start SYBR Green (Roche) kit ve Çizelge 4.5.'de yer alan primerler kullanılarak Çizelge 4.9.'daki miktarlara uygun olarak qRT-PCR deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.9. qRT-PCR yönteminde kullanılan reaktif ve miktarları

| Reaktif          | Hacim (µL) / Reaksiyon |
|------------------|------------------------|
| SYBR Green Mix   | 5.0                    |
| FP               | 0.4                    |
| RP               | 0.4                    |
| H <sub>2</sub> O | 3.2                    |
| cDNA (10 ng/µL)  | 1.0                    |
| Toplam           | 10.0                   |

#### 4.2.2.10. KLF4 Protein Düzeyinin FFPE Doku Örneklerinde İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

KLF4 ifadesinin normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser durumundaki değişimini incelemek amacıyla daha önce qRT-PCR analizleri için kullanılan 17 normal, 13 LSIL, 12 HSIL ve 18 SCC olgusuna ait FFPE dokulara immunohistokimya yöntemi uygulanmıştır. İlk aşamada parafin bloklardan adezivli lamlara 5µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Boyama işlemi otomatik immunohistokimya boyaması yapan “OMNIS (Dako, Danimarka)” cihazında gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kesitler 1 saat 60°C'lik etüvde bekletilerek

parafinin erimesi sağlandı. Deparafinizasyon işlemi için camlara makinede 25<sup>0</sup>C’de 1 dakika “Clearify” solüsyonu uygulanmıştır. Dokularda bulunan antijenlerin açığa çıkarılabilmesi için 30 dakika 97<sup>0</sup>C’de EDTA tamponunda inkübasyon yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından dokulara 30 dakika KLF4 antikoruna 1:200 konsantrasyonda uygulanmıştır. Boyanma kuvvetini arttırmak amacıyla dokular 20 dakika “Rabbit linker” ile inkübe edilmiştir. Özgöl olmayan zemin boyanmasının önlenmesi için dokulara 3 dakika peroksit blokaj yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından dokulara HRP solüsyonu uygulanarak 20 dakika inkübe edilmiştir. Kesitlere enzim substratı ve kromojen içeren çalışma solüsyonu damlatılarak 5 dakika bekletilmiştir. Son basamakta 5dk hematoksilin uygulaması yapılmıştır. Dokular alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek entellan ile kapatılmıştır.

KLF4 ifadesinin normal, prekanseröz lezyonlar ve invaziv kanser durumlarındaki ifade değişimi araştırılırken, skuamöz epitel tabakasındaki KLF4 boyanma yüzdesi değerlendirilmiştir.

#### **4.2.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEYLERİ İLE DOĞRULAMA ALIşMALARI**

Biyoinformatik analizler ve bağımsız örnekler ile yapılan qRT-PCR deneyleri sonucunda öne çıkan miR-25’in servikal kanser üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla *in-vitro* deneyler geerleştirilmiştir. Bu deneylerde serviks kanseri hücre hattı olan HeLa hücreleri kullanılmıştır. Mir-25’in serviks kanseri gelişiminde proliferasyon ve motilite gibi biyolojik süreçlerdeki etkisinin araştırılmasında aşağıdaki yöntemler kullanılmıştır.

##### **4.2.3.1. Hücre Kültürü Sisteminin Kurulması ve Devam Ettirilmesi**

HeLa hücreleri DMEM besiyeri kullanılarak, 37 <sup>0</sup>C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültür edilmiştir. Hücreler T-25 ve T-75 flasklarda devam ettirilmiştir. Belirli aralıklarda flasklardaki hücre yoğunluğu takip edilmiş ve doluluk oranı yaklaşık %80 olduğunda hücreler tripsin enzimi yardımıyla flask zemininden kaldırılarak pasajlanmıştır. Uzun süre saklanacak olan hücreler kriyovialler içinde, %90 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma karışımına koyularak sıvı nitrojene koyulmuştur.

#### 4.2.3.2. Transfeksiyon

Serviks kanseri oluşum ve gelişim sürecinde onkojenik rol oynadığı belirlenen miR-25'in proliferasyon, invazyon ve motilite üstündeki etkisini araştırmak amacıyla öncelikle Hela hücrelerine hsa-miR-25-hairpin inhibitör ve kontrol amacıyla inhibitör negatif kontrol (scr) uygulanarak bu miRNA'nın inhibisyonu sağlanmıştır. Transfeksiyon için uygulanan prosedür aşağıdaki gibidir.

1. Her kuyu için; 8µl inhibitör ile 38µl FBS ve antibiyotik içermeyen DMEM mediumu karıştırılarak 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. Her kuyu için; 1.6 µl DharmaFect -1 Transfection Reagent ve 39.6µl FBS ve antibiyotik içermeyen DMEM karıştırılarak 5dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Hazırlanan inhibitör içeren karışım ile transfeksiyon reaktifi içeren karışım her kuyu için hesaplanan miktarlara göre karıştırılarak 20dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Başka bir tüpün içinde her kuyucuk için 360µl antibiyotik içermeyen medium+%10 FBS hesaplanarak karıştırıldı.
5. Inhibitör+ transfeksiyon reaktifi içeren karışımlar ile antibiyotik içermeyen %10 FBS eklenmiş karışım karıştırıldı.
6. Her kuyuya 400µl karışım eklenerek hücreler inkübasyona bırakıldı.

#### 4.2.3.3. Hücre Proliferasyonunun Araştırılması

MiR-25'in proliferasyon üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla hücreler tripsinlenip kaldırılarak hücre sayımı yapılmıştır. 6 kuyulu plakalar kullanılarak, hücreler her kuyuda 150.000 adet olacak şekilde sayılarak ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Her uygulama için 2 biyolojik tekrar ile çalışılmıştır. Ekim işleminden 24 saat sonra 2 kuyuya sadece transfeksiyon reaktifi, 2 kuyuya inhibitör negatif kontrolü ve 2 kuyuya da inhibitör uygulaması ile transfeksiyon yapılmıştır. Hücrelerin büyüme hızı “xCELLigence real-time cell analyzer” cihazı ile izlenmiştir.

#### 4.2.3.4. Hücrelerin Motilitelerinin Belirlenmesi

MiR-25'in hücrelerin motilitesi üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla “Wound Healing Assay (WHA)” yapılmıştır. Bu yöntemde kuyudaki hücrelerin arasında bir “çizik” oluşturularak, hücrelerin *in vitro* koşullarda hücre göçüyle bu boşluğu kapatıp-kapatamadığı izlenmiştir.

Deneyin ilk aşamasında hücre sayımı yapılarak her kuyuda 200.000 hücre olacak şekilde 6 kutucuklu plakalara ekim işlemi yapılmış ve 24 saat sonra miR-25 inhibitör ve inhibitör kontrol ile transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonun ardından hücre katmanının ortasında 20µl'lik pipet ucu ile çizik oluşturulmuştur. Bu işlemlerin ardından başlangıçtan itibaren 24 saat boyunca “xCELLigence real-time cell analyzer” cihazı ile hücrelerin hareketi izlenmiştir. Elde edilen görüntüler “Image J” programında analiz edilmiştir.

#### 4.2.4. PROTEİN İZOLASYONU

Hela hücreleri 6 kuyulu plakalara ekildikten ve miR-25 inhibitörü ile transfeksiyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra 72 saat beklenerek hücreler toplanmıştır. PBS+hücre karışımı 2000g'de 5 dakika santrifüj edilerek hücre peleti dibe çöktürülmüştür. Süpernatant boşaltılarak peletin üzerine 50µl *Lysis Buffer* eklenerek, shaker'ın üzerinde 5dk karıştırılmıştır. Daha sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. İçinde proteinleri bulunduran süpernatant temiz bir tüpe alınmıştır. 96 kuyulu plakada kuyulara 2.5µl örnek koyulmuş ve üzerlerine 197,5µl *Coomassie Plus Bradford Assay* eklenmiştir. Protein ölçümleri Tecan (marka, ülke) cihazında yapılmıştır. Örneklerdeki protein miktarını hesaplamak için değişen konsantrasyonlardaki BSA ile standart eğri çizilmiştir. Örneklerde bulunan protein miktarı Çizelge 4.10.'daki gibidir.

Çizelge 4.10. Transfeksiyon yapılan hücrelerden elde edilen protein miktarları

| Örnek Adı                 | Protein Miktarı (ng/µl) |
|---------------------------|-------------------------|
| Hela_Control_1            | 2711.83                 |
| Hela_Control_2            | 2550.83                 |
| Hela_Control_3            | 2537.17                 |
| Hela_scr_1                | 1194.33                 |
| Hela_scr_2                | 1119.99                 |
| Hela_scr_3                | 1096.17                 |
| Hela_scr_4                | 2181                    |
| Hela_scr_5                | 2078.33                 |
| Hela_miR-25_1 (İnhibitör) | 1128.50                 |
| Hela_miR-25_2 (İnhibitör) | 1218.49                 |
| Hela_miR-25_3 (İnhibitör) | 1562.67                 |
| Hela_miR-25_4 (İnhibitör) | 1408.67                 |

#### 4.2.5. WESTERN BLOT DENEYLERİ

Protein izolasyonundan sonra her örnek için 15000ng olacak şekilde hesaplamalar yapılmış ve protein örnekleri x2 protein sample loading buffer ile 1:1 oranında karıştırılarak 95 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Çalışılacak proteinin ağırlığına (kDa) göre SDS page işlemleri sırasında kullanılacak resolving jel %’si seçilmiş ve buna göre jel hazırlanmıştır. %12’lik resolving jel Çizelge 4.11. ve stacking jel Çizelge 4.12.’de gösterilen malzeme ve miktarlar kullanılarak hazırlanmıştır. Jeller hazırlanırken TEMED en son aşamada eklenmiştir. Resolving jel döküldükten sonra üzerleri hava ile temasın kesilebilmesi için %100’lük etanol ile kaplanmıştır. Polimerleşme gerçekleştikten sonra jelin üzerindeki etanol distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmış, stacking jel koyulmadan önce fazla su kurutma kağıdı ile toplanmıştır. Üzerine stacking jel dökülmüş ve tараğın yönüne dikkat edilerek içine yerleştirilmiştir. Polimerleşme tamamlandığında kuyulara dikkat edilecek taraklar çekilmiştir. Jel yürütme tankına yerleştirilir ve tank running buffer ile doldurulmuştur. Kuyular enjektör yardımıyla tampon solüsyonu ile dikkatlice yıkanmıştır. Örnekler kuyulara yüklenmiş ve yürüme protein ladder yardımıyla takip edilmiştir. Örnekler stacking jeli geçene kadar 80V’da daha sonra 100V da yürütülmüştür.

Çizelge 4.11 .Resolving jel malzemeleri ve kullanım miktarları

| %12'lik resolving jel malzemeleri | Jel miktarı (ml) |
|-----------------------------------|------------------|
|                                   | 10ml             |
| ddH <sub>2</sub> O (ml)           | 3.3              |
| %30 Ac/BisAc (ml)                 | 4                |
| 1.5M Tris (pH=8.8) (ml)           | 2.5              |
| %10 SDS (µl)                      | 100              |
| %10 APS (µl)                      | 100              |
| TEMED (µl)                        | 4                |

Çizelge 4.12. Stacking jel malzemeleri ve kullanım miktarları

| %5'lik stacking jel malzemeleri | Jel miktarı (ml) |
|---------------------------------|------------------|
|                                 | 5ml              |
| ddH <sub>2</sub> O (ml)         | 3.4              |
| %30 Ac/BisAc (ml)               | 0.83             |
| 1.5M Tris (pH=6.8) (ml)         | 0.63             |
| %10 SDS (µl)                    | 50               |
| %10 APS (µl)                    | 50               |
| TEMED (µl)                      | 5                |

Transfer aşaması için polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane jelin boyutuna göre kesilmiştir ve aktifleşmesi için metanole koyulmuştur. Daha sonra sırayla distile su ve transfer buffer'a alınmış, kurutma kağıtları ve süngerler transfer bufferda ıslatılmıştır. Yürütme tankından jel çıkarılmış ve stacking jel kısmı kesilerek atılmıştır. Transfer yönüne dikkat edilerek sünger, jel, membran ve kurutma kağıtları yerleştirilmiştir. Transfer işlemi soğuk odada 70V'da 90dk'da gerçekleştirilmiştir. Transfer bittikten sonra membran blokaj işlemi için %5'lik süt tozu solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcının üzerinde bekletilmiştir. TBS-T ile yıkama işleminin ardından primer antikor ile inkübasyon işlemi ACTB boyaması için 1 saat oda sıcaklığında, diğer antikorlar için gece boyunca soğuk odada çalkalayıcının üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından primer antikora uygun olarak seçilmiş sekonder antikor membranın üzerine koyulmuş ve 1 saat karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tekrar yıkama işlemi uygulanmış ve HRP görüntüleme kiti kullanılarak LI-COR cihazı ile görüntüleme yapılmıştır. Proteinlere ait jel görüntüleri "Image J" programında analiz edilmiştir.

#### 4.2.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmada meta-analiz çalışması algoritmasında iki ya da daha fazla gruba ait ortalamalar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığını belirlemek amacıyla ANOVA analizi kullanılmıştır. qRT-PCR analizleri sonucunda normal, LSIL, HSIL ve SCC gruplarına ait miRNA ve mRNA ifade verilerinin karşılaştırılmasında, verilerin normal dağılım gösterip göstermemesine göre uygun post hoc testi seçilerek ANOVA ya da Kruskal Wallis analizleri yapılmıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. Diğer tüm istatistiksel analizlerde iki grubun karşılaştırılmasında örneklerin dağılımına göre t-test ya da Mann Whitney U yöntemi, çoklu grupların karşılaştırılmasında ise ANOVA ya da Kruskal Wallis analizleri yapılmıştır.  $p < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.



## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZLER SONUCUNDA ELDE EDİLEN BULGULAR

#### 5.1.1. META-ANALİZ SONUCUNDA ELDE EDİLEN MİRNA LİSTESİ

Laboratuvarımızda daha önceki çalışmalar ile geliştirilmiş olan ANOVA temelli ve sıralama tabanlı meta-analiz algoritması ile gruplar arasında ifade farklılığı gösteren 70 adet miRNA belirlenmiş ve bu miRNA'lara ait liste Çizelge 5.1.'de verilmiştir (76). Bu listedeki ilk 10 miRNA çalışmaya dahil edilmiş ve ileri analizlere bu miRNA'lar ile devam edilmiştir.

Çizelge 5.1. Meta-analiz ile gruplar arasında ifade farklılığı gösterdiği belirlenen miRNA'ların listesi

| miRNA          | Sıralamaları<br>n<br>Ortalaması | P değeri<br>Ortalaması | miRNA          | Sıralamaları<br>n<br>Ortalaması | P değeri<br>Ortalaması |
|----------------|---------------------------------|------------------------|----------------|---------------------------------|------------------------|
| hsa-miR-200a*  | 33.5                            | 0.013                  | hsa-miR-148b   | 139                             | 0.226                  |
| hsa-let-7i     | 36.5                            | 0.039                  | hsa-miR-485-3p | 142                             | 0.322                  |
| hsa-miR-145    | 46                              | 0.037                  | hsa-miR-181a   | 143                             | 0.218                  |
| hsa-miR-150    | 53                              | 0.036                  | hsa-miR-24     | 146                             | 0.235                  |
| hsa-miR-29a    | 58.5                            | 0.079                  | hsa-miR-15a    | 147.5                           | 0.262                  |
| hsa-miR-204    | 59                              | 0.069                  | hsa-miR-424    | 151                             | 0.392                  |
| hsa-miR-25     | 59.5                            | 0.087                  | hsa-miR-135b   | 152                             | 0.308                  |
| hsa-miR-143    | 60.5                            | 0.054                  | hsa-let-7g     | 153                             | 0.246                  |
| hsa-miR-26a    | 68                              | 0.089                  | hsa-miR-660    | 162.5                           | 0.331                  |
| hsa-let-7d     | 78                              | 0.0812                 | hsa-miR-151    | 164                             | 0.319                  |
| hsa-miR-15b    | 80.5                            | 0.085                  | hsa-miR-195    | 165.5                           | 0.354                  |
| hsa-miR-125b   | 81                              | 0.138                  | hsa-miR-29c    | 167                             | 0.362                  |
| hsa-miR-148a   | 82                              | 0.129                  | hsa-miR-196b   | 169.5                           | 0.616                  |
| hsa-miR-103    | 96                              | 0.106                  | hsa-miR-27b    | 170.5                           | 0.319                  |
| hsa-miR-324-3p | 98                              | 0.329                  | hsa-miR-602    | 172                             | 0.295                  |
| hsa-miR-199a*  | 101.5                           | 0.148                  | hsa-miR-19b    | 175                             | 0.411                  |
| hsa-miR-494    | 102.5                           | 0.199                  | hsa-miR-381    | 178                             | 0.386                  |
| hsa-miR-609    | 104                             | 0.205                  | hsa-miR-370    | 180.5                           | 0.461                  |

|                |       |       |                |       |       |
|----------------|-------|-------|----------------|-------|-------|
| hsa-miR-214    | 110   | 0.259 | hsa-miR-221    | 182   | 0.359 |
| hsa-miR-185    | 112.5 | 0.186 | hsa-miR-141    | 183.5 | 0.356 |
| hsa-miR-20a    | 112.5 | 0.146 | hsa-miR-20b    | 184.5 | 0.361 |
| hsa-miR-340    | 112.5 | 0.183 | hsa-miR-363    | 188   | 0.407 |
| hsa-miR-26b    | 113   | 0.136 | hsa-miR-564    | 188.5 | 0.378 |
| hsa-miR-765    | 113.5 | 0.356 | hsa-miR-31     | 201   | 0.419 |
| hsa-miR-100    | 116.5 | 0.161 | hsa-miR-200b   | 206   | 0.586 |
| hsa-miR-30b    | 117   | 0.151 | hsa-miR-30c    | 207   | 0.448 |
| hsa-miR-181b   | 120   | 0.214 | hsa-miR-346    | 207.5 | 0.455 |
| hsa-miR-27a    | 126   | 0.224 | hsa-miR-155    | 213   | 0.467 |
| hsa-miR-130a   | 127.5 | 0.203 | hsa-miR-365    | 214.5 | 0.475 |
| hsa-miR-222    | 134.5 | 0.226 | hsa-miR-182    | 216   | 0.536 |
| hsa-miR-451    | 135   | 0.198 | hsa-miR-186    | 225.5 | 0.499 |
| hsa-miR-647    | 135.5 | 0.231 | hsa-miR-18a*   | 228   | 0.582 |
| hsa-miR-769-5p | 137   | 0.216 | hsa-miR-504    | 229   | 0.627 |
| hsa-miR-106a   | 138   | 0.217 | hsa-miR-126    | 234   | 0.549 |
| hsa-miR-101    | 139   | 0.227 | hsa-miR-324-5p | 241   | 0.596 |

### 5.1.2. GRUPLAR ARASINDA İFADESİ DEĞİŞEN MRNA'LARIN BELİRLENMESİ

İki mRNA mikrodizin verisi ile BRB ArrayTools kullanılarak yapılan mRNA analizinde LSIL, HSIL ve SCC gruplarındaki mRNA ifadeleri normal örnekler ile karşılaştırılmıştır. Analiz sırasında 2 kat ve üzerinde ifade farklılığı gösteren ve  $p < 0.05$  olacak şekilde DE mRNA listeleri oluşturulmuştur. Bu analizler sonucunda normal-LSIL, normal-HSIL ve normal-SCC grupları karşılaştırılarak elde edilen DE mRNA listeleri kesiştirilerek tek bir ortak DE mRNA listesi oluşturulmuştur. Toplamda normal gruba göre ifade farklılığı gösteren 148 adet mRNA belirlenmiştir. Bu mRNA'lara ait liste Çizelge 5.2.'de verilmiştir.

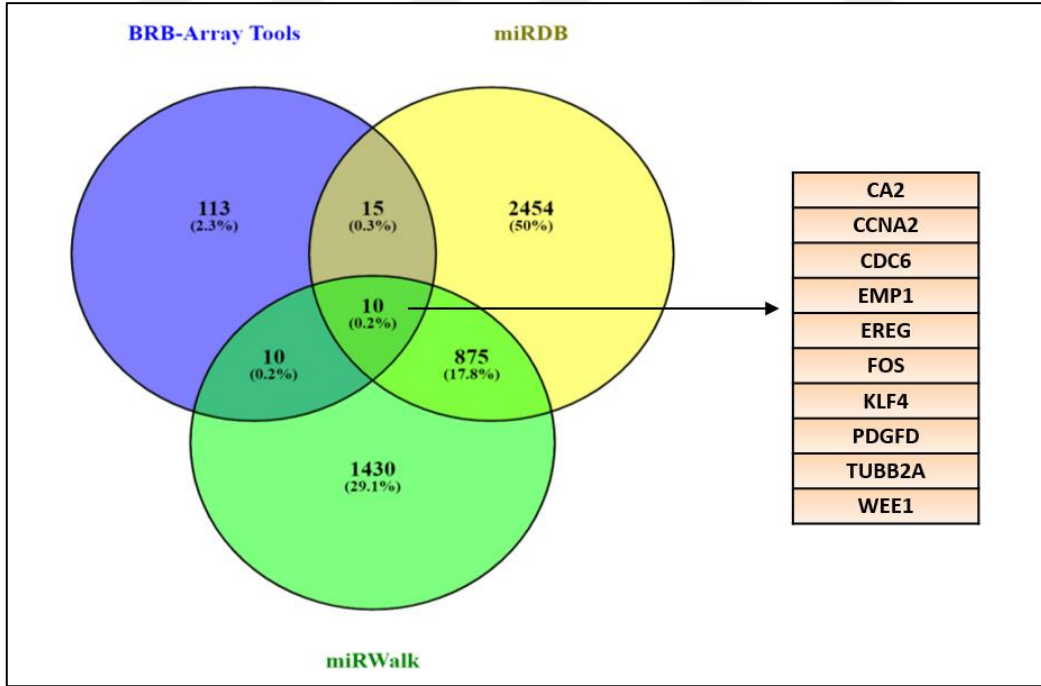
Çizelge 5.2. Gruplar arasında ifadesi değişen mRNA listesi

| Normal-LSIL, Normal-HSIL, Normal-SCC ortak DE listesi |          |          |          |
|-------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| ABI3BP                                                | CYR61    | HMMR     | RAD51AP1 |
| ADAMTS1                                               | DDIT4    | HOXB6    | RAD54B   |
| ALOX12                                                | DHFR     | HS6ST2   | RFC3     |
| ALOX12B                                               | DLGAP5   | HSPB8    | RGS1     |
| ANKRD36BP2                                            | DMBT1    | ID4      | RPTN     |
| APOBEC3B                                              | DNASE1L3 | IFI44    | SCGB1D2  |
| AREG                                                  | DONSON   | IFI44L   | SCGB2A1  |
| ATP6V1C2                                              | DSG2     | IL1R1    | SERPINB2 |
| AURKA                                                 | DTL      | IL1R2    | SH3GL3   |
| BUB1                                                  | DUSP1    | IVL      | SHCBP1   |
| C14orf132                                             | ECT2     | JUN      | SLC16A3  |
| CA2                                                   | EGR1     | KCNJ15   | SLC27A6  |
| CALML3                                                | EGR3     | KIAA0101 | SLURP1   |
| CCNA2                                                 | EMP1     | KIF4A    | SMC2     |
| CCNB1                                                 | EMX2     | KLF2     | SMC4     |
| CCNL1                                                 | EPCAM    | KLF4     | SOSTDC1  |
| CD83                                                  | EREG     | KRT2     | SOX17    |
| CDC6                                                  | ETS2     | KRT24    | SPRR1A   |
| CDC7                                                  | F3       | KRT6B    | STAT1    |
| CDK1                                                  | FAM26F   | LAMP3    | STIL     |
| CDKN2A                                                | FAM3D    | LONRF1   | SYCP2    |
| CENPU                                                 | FCER1A   | LRRFIP1  | TCN1     |
| CEP55                                                 | FCGBP    | LTF      | TFCP2L1  |
| CFTR                                                  | FMO2     | MOCOS    | TFF3     |
| CHL1                                                  | FOLR1    | MPPED2   | TGM3     |
| CITED2                                                | FOS      | MSX1     | TIMP2    |
| CLDN10                                                | GBP1     | MUC5AC   | TOP2A    |
| CLU                                                   | GEM      | MYO1B    | TRIB1    |
| CMPK2                                                 | GIN51    | NDC80    | TSPAN12  |
| CRISP2                                                | GMNN     | NEFL     | TTK      |
| CRISP3                                                | GPX3     | NR4A2    | TUBB2A   |

|        |          |         |         |
|--------|----------|---------|---------|
| CRYAB  | GREM1    | PDGFD   | UGT2B17 |
| CTLA4  | GYS2     | POLQ    | UPK1B   |
| CXCL10 | HELLS    | PROM1   | UPP1    |
| CXCL12 | HERC5    | PRUNE2  | WEE1    |
| CXCL14 | HIST1H1C | PSMC3IP | WFDC2   |
| CXCR4  | HIST1H3H | PTHLH   | ZBED2   |

### 5.1.3. META-MİRNA HEDEFLERİNİN BİYOİNFORMATİK OLARAK BELİRLENMESİ VE DE MRNA'LAR İLE KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmaya dahil edilen meta-miRNA'ların deneysel olarak doğrulanmış hedef genleri miRDB ve miRWalk internet araçları kullanılarak belirlenmiştir. 10 adet meta-miRNA'ya ait hedeflerin sayısı miRDB kullanılarak 3354 adet, miRWalk kullanılarak 2325 adet olarak bulunmuştur. Bu araçlardan elde edilen listeler ve BRB Array Tools ile yapılan mRNA analizi sonrasında elde edilen DE mRNA listesi Venny web aracı kullanılarak kesiştirilmiştir. Karşılaştırmalar sonucunda üç listede ortak olarak bulunan 10 adet mRNA olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.1.)(Çizelge 5.3.).



Şekil 5.1. Farklı internet veri tabanlarından elde edilen meta-miRNA hedefleri ve mRNA analizi kullanılarak belirlenen, gruplar arasında ifadesi değişen ortak mRNA sayılarına ait ven şeması

Çizelge 5.3. Farklı internet veri tabanları kullanılarak belirlenen meta-miRNA hedef listeleri ve mRNA analizi sonucunda gruplar arasında ortak olarak ifadesi değişen mRNA'ların karşılaştırması sonucu elde edilen mRNA'lara ait listeler

| <b>miRDB meta-miRNA hedefleri-mRNA analizi sonucunda elde edilen DE mRNA'lar</b> | <b>miRWalk meta-miRNA hedefleri- mRNA analizi sonucunda elde edilen DE mRNA'lar</b> | <b>miRDB-miRWalk- mRNA analizi sonucunda elde edilen DE mRNA'lar</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| CA2                                                                              | SOX17                                                                               | CA2                                                                  |
| CCNA2                                                                            | DUSP1                                                                               | CCNA2                                                                |
| CCNL1                                                                            | TUBB2A                                                                              | CDC6                                                                 |
| CDC6                                                                             | CFTR                                                                                | EMP1                                                                 |
| CHL1                                                                             | KLF4                                                                                | EREG                                                                 |
| CITED2                                                                           | PDGFD                                                                               | FOS                                                                  |
| CXCL14                                                                           | STAT1                                                                               | KLF4                                                                 |
| EGR1                                                                             | AURKA                                                                               | PDGFD                                                                |
| EMP1                                                                             | DDIT4                                                                               | TUBB2A                                                               |
| EREG                                                                             | POLQ                                                                                | WEE1                                                                 |
| ETS2                                                                             | CA2                                                                                 |                                                                      |
| FOS                                                                              | CDC6                                                                                |                                                                      |
| GBP1                                                                             | TTK                                                                                 |                                                                      |
| GINS1                                                                            | WEE1                                                                                |                                                                      |
| IFI44L                                                                           | CCNA2                                                                               |                                                                      |
| KLF4                                                                             | CDC7                                                                                |                                                                      |
| MYO1B                                                                            | EMP1                                                                                |                                                                      |
| NEFL                                                                             |                                                                                     |                                                                      |
| NR4A2                                                                            |                                                                                     |                                                                      |
| PDGFD                                                                            |                                                                                     |                                                                      |
| PTHLH                                                                            |                                                                                     |                                                                      |
| RGS1                                                                             |                                                                                     |                                                                      |
| SOSTDC1                                                                          |                                                                                     |                                                                      |
| TUBB2A                                                                           |                                                                                     |                                                                      |
| WEE1                                                                             |                                                                                     |                                                                      |

mRNA mikrodizin verileri kullanılarak yapılan karşılaştırma analizleri sonucunda sadece gruplar arasında ifade farklılığı gösteren mRNA'lar bulunmakla kalmamış aynı zamanda miRNA hedefleri ile ortak olduğu belirlenen mRNA'ların normalden artan displazi seviyesi ve tümöre doğru gidildikçe ifadelerindeki artma ya da azalma durumları da ortaya çıkarılmıştır (Çizelge 5.4.).

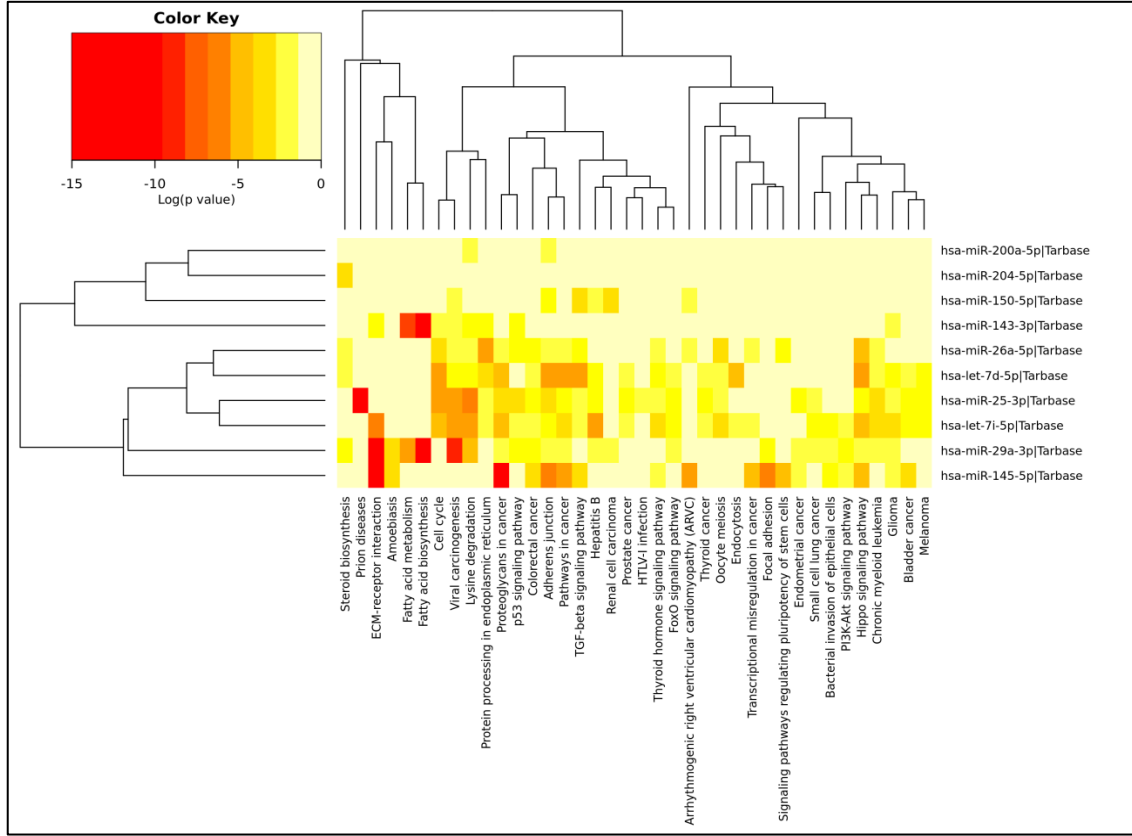
Çizelge 5.4. Belirlenen mRNA hedeflerinin mikrodizin verileri kullanılarak yapılan analizler sonucunda belirlenen gruplar arasındaki değişim yönleri

| mRNA   | GSE27678    |             |            | GSE63514    |             |            |
|--------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|
|        | Normal-LSIL | Normal-HSIL | Normal-SCC | Normal-LSIL | Normal-HSIL | Normal-SCC |
| PDGFD  | Azalma      | Azalma      | Azalma     | -           | -           | Azalma     |
| EREG   | Azalma      | Azalma      | -          | -           | Azalma      | Azalma     |
| CCNA2  | Artma       | Artma       | Artma      | -           | -           | -          |
| FOS    | Azalma      | Azalma      | Azalma     | -           | -           | -          |
| KLF4   | Azalma      | Azalma      | Azalma     | -           | -           | Azalma     |
| TUBB2A | Azalma      | Azalma      | -          | -           | -           | Azalma     |
| CA2    | Artma       | Artma       | Artma      | -           | -           | -          |
| CDC6   | Artma       | Artma       | Artma      | -           | Artma       | Artma      |
| EMP1   | Azalma      | Azalma      | Azalma     | -           | Azalma      | Azalma     |
| WEE1   | Azalma      | Azalma      | -          | -           | -           | Artma      |

#### 5.1.4. META-MİRNA'LARIN HEDEFLERİNİN ROL OYNADIĞI SİNYAL YOLAKLARI

Meta-miRNA hedeflerinin hangi sinyal yollarında görev aldığını belirlemek amacıyla DIANA-mirPath tool kullanılarak sinyal yolağı zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda yapılan iki yönlü hiyerarşik kümeleme analizi ile de meta-miRNA'lar arasındaki ilişkinin belirlenmesini sağlamıştır. Bu analizler sonucunda 10 meta-miRNA arasından miR-25, let-7i, miR-26a, let-7d ve miR-29a'un hiyerarşik sınıflamada anlamlı bir şekilde diğerlerinden ayrıldığı gözlenmiştir. Bunlara ek olarak meta-miRNA hedeflerinin servikal kanser gelişimde önemli önemli olabilecek hücre döngüsü, p53 sinyal yolağı, ECM-reseptör etkileşimleri, adherens bağlantılar ve viral karsinogenez gibi sinyal yollarında rol oynadıkları saptanmıştır.

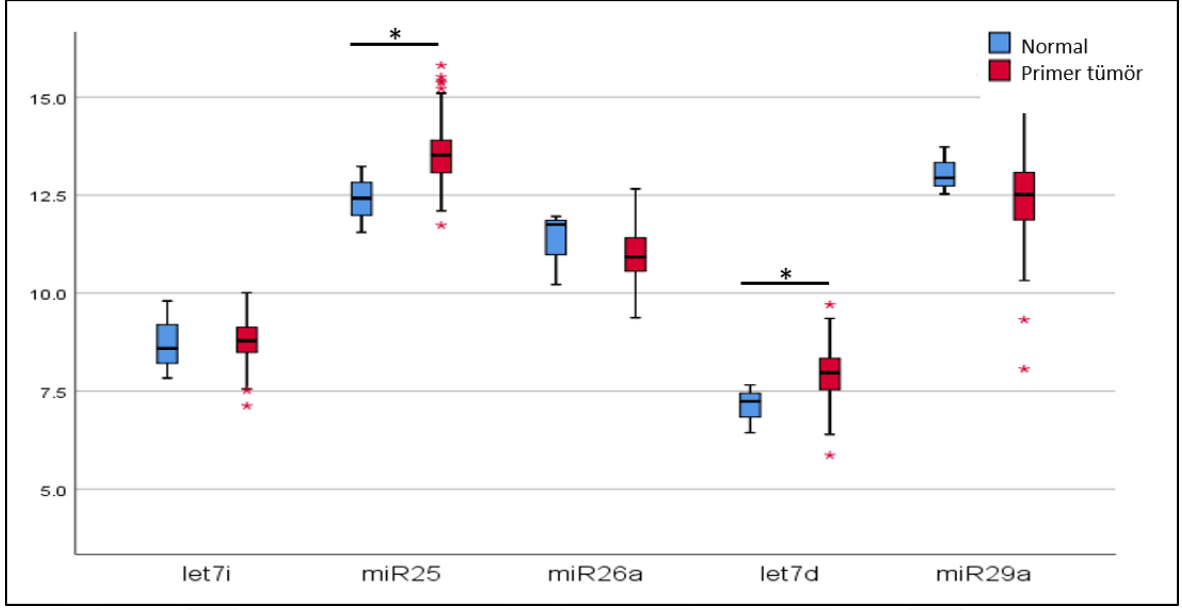
Bu bulgular sonucunda ortak sinyal yollarında rol oynayan ve diğer miRNA'lerden ayrılan miR-25, let-7i, miR-26a, let-7d ve miR-29a ile ileri analizlere devam edilmesine karar verilmiştir (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. İlk 10 meta-miRNA'ya ait sinyal yolağı zenginleştirme analizi sonuçları

### 5.1.5. TCGA VERİ ANALİZİ

Yolak analizinden sonra ileri çalışmalarda araştırılmak için seçilen meta-miRNA'ların normal ve tümör grupları arasındaki değişim paternleri "TCGA servikal kanser" verileri kullanılarak araştırılmıştır. Let-7i, miR-25 ve let-7d ifadelerinin tümör örneklerinde normale göre artarken, miR-29a ve miR-26a ifadelerinin azaldığı saptanmıştır (Şekil 5.3.).

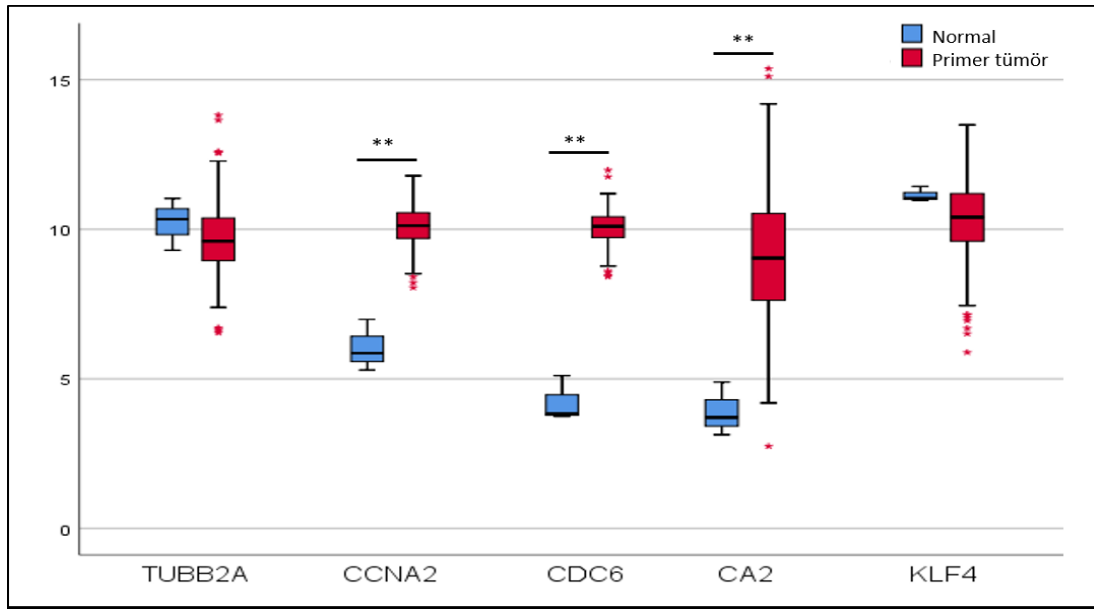


Şekil 5.3. CESC veri seti kullanılarak elde edilen TCGA veri analizi sonuçları, Mann Whitney U,  $p < 0.05$

Bu aşamadan sonra ileri analizlerde araştırılmaya devam edilecek en güçlü gen adaylarını belirlemek amacıyla, seçilen meta-miRNA'ların TCGA analizi sonuçlarına göre normal ve tümör grupları arasındaki değişim yönleri ile hedefleri olan genlerin mRNA analizlerinde normal, prekanseröz lezyonlar ve tümör grupları arasındaki değişim paternleri birlikte değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Daha sonra bu hedeflerden miRNA'lar ile zıt yönlü olarak ifadesi değişen genler üzerine odaklanılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda TUBB2A, CCNA2, KLF4, CA2 ve CDC6 genlerinin öne çıktığı görülmüştür (Çizelge 5.5.). Yine TCGA servikal kanser verileri kullanılarak yapılan analizde tüm bu genlerin karşılaştırma analizi sonuçlarıyla uyumlu olarak normal ve tümör örnekleri arasında aynı yönde değişim gösterdiği saptanmıştır (Şekil 5.4.). Bağımsız sitoloji ve FFPE örneklerinde doğrulama çalışmalarına Çizelge 5.6.'da gösterilen miRNA ve genler ile devam edilmesine karar verilmiştir

Çizelge 5.5. Meta-miRNA'lar ve hedeflerinin normalden tümöre doğru değişim yönü

| meta-miRNA  | Değişim Yönü | Hedef Gen                     |             |
|-------------|--------------|-------------------------------|-------------|
|             |              | Azalan                        | Artan       |
| hsa-let-7i  | Artma        | TUBB2A                        |             |
| hsa-miR-29a | Azalma       | TUBB2A<br>KLF4<br>FOS<br>EMP1 | CCNA2       |
| hsa-miR-25  | Artma        | KLF4                          |             |
| hsa-miR-26a | Azalma       | KLF4<br>WEE1                  | CA2<br>CDC6 |
| hsa-let-7d  | Artma        |                               |             |



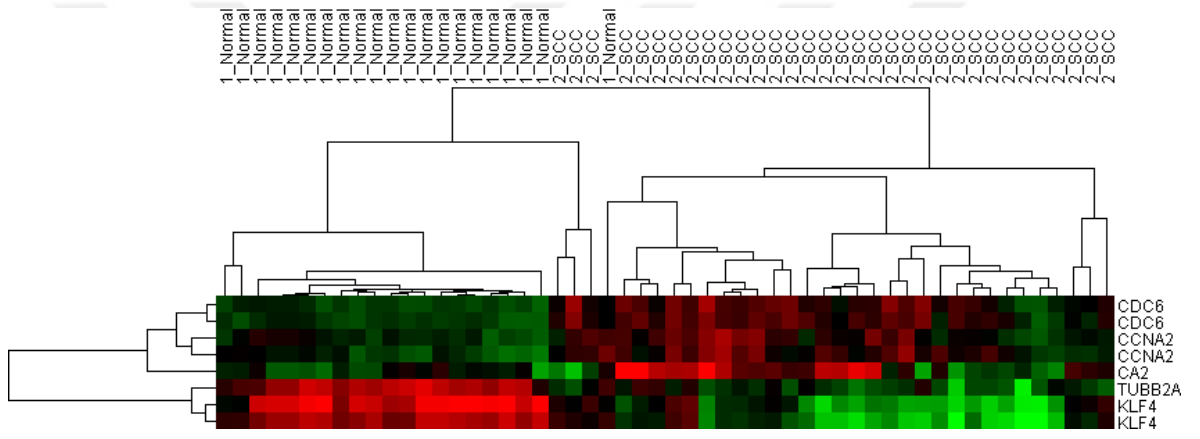
Şekil 5.4. Hedef mRNA'lar ile CESC veri seti kullanılarak elde edilen TCGA veri analizi sonuçları, Mann Whitney U, \*\*p <0.01

Çizelge 5.6.Çalışmaya dahil edilen meta-miRNA ve hedefleri

| Meta-miRNA              | Hedef gen |
|-------------------------|-----------|
| let-7i, let-7d, miR-29a | TUBB2A    |
| miR-25, miR-29a         | KLF4      |
| miR-26a                 | CA2, CDC6 |
| miR-29a                 | CCNA2     |
| miR-26a                 | CDC6      |

### 5.1.6. META-MİRNA HEDEFLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN KÜMELEME ANALİZİ SONUÇLARI

Normal örnekler, servikal lezyonlar (LSIL, HSIL) ve kanser örnekleri (SCC) arasında farklılık gösterdiğini tespit ettiğimiz 5 miRNA'nın hedef gen listeleri ve bağımsız mRNA çalışmaları ile gerçekleştirilen analizler sonrasında kararlı bir şekilde normal, LSIL, HSIL ve SCC arasında farklılık gösteren genler olarak belirlediğimiz 5 adet genin ifade seviyeleri GSE9750 kodlu bağımsız bir çalışmada analiz edilmiştir. 21 adet normal ve 33 adet tümör örneği içeren bu çalışmada yapmış olduğumuz hiyerarşik kümeleme analizi sonucunda seçmiş olduğumuz 5 genin ifade profillerinin bu örnekleri anlamlı şekilde normal ve tümör olarak sınıflandırabildiği gözlenmiştir (Şekil 5.5.).



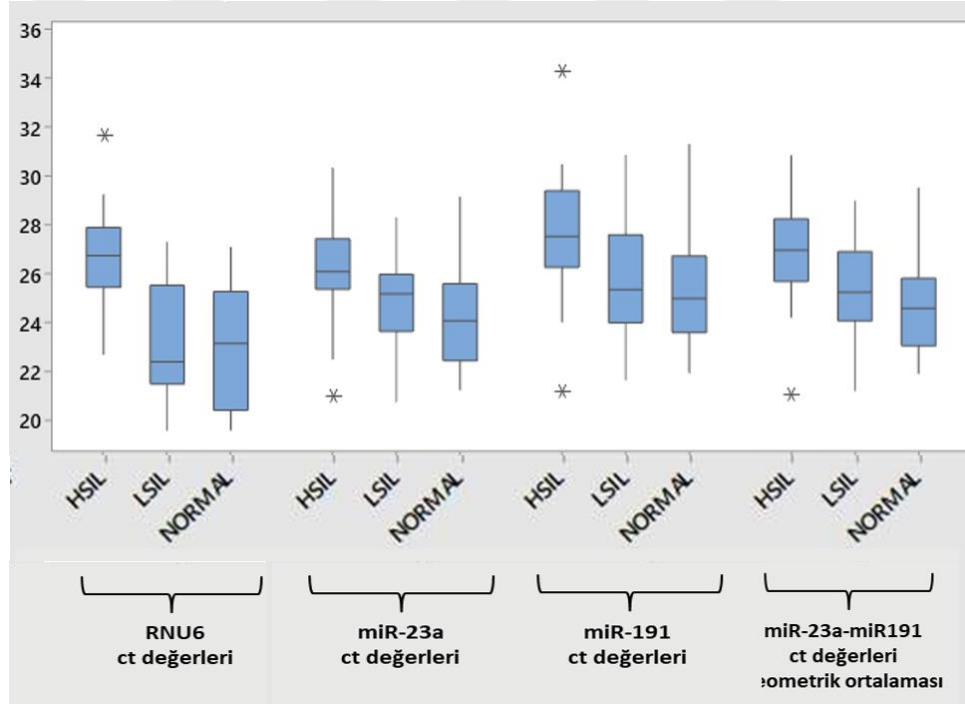
Şekil 5.5 .mRNA analizleri ile öne çıkan DE mRNA'lar ile yapılan kümeleme analizine ait heatmap. Örnekler ilgili mRNA ifade durumlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kümelenmişlerdir, Mann-Whitney U,  $p < 0.01$

## 5.2. DENEYSEL ANALİZLER SONUCUNDA ELDE EDİLEN BULGULAR

### 5.2.1. REFERANS GEN SEÇİMİ

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda serviks dokusunda yapılan qRT-PCR analizlerinde farklı miRNA'ların referans olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Referans olarak kullanılacak en uygun miRNA'nın seçilmesi için daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan referans miRNA'lara odaklanılmıştır. Leitao ve ark.'larının yaptığı çalışmada kullanılabilecek en iyi kombinasyonun miR-23a ve miR-191 kombinasyonuna ait Ct değerleri olduğu gösterilmiştir (83). Bu bilgi ışığında çalışmamızdaki örneklerin analizlerinde kullanılacak en uygun

referans miRNA'yı belirlemek amacıyla "Normfinder" algoritması kullanılmıştır (84). Sitoloji örnekleri ile yapılan qRT-PCR deneyleri sonucunda elde edilen RNU6, miR-23a, miR-191 Ct değerleri ve miR-23a-miR-191 Ct değerlerinin geometrik ortalaması ile analiz yapılmıştır. Bu analiz sonucunda en iyi referans adayının miR-23a ve miR-191 Ct değerlerinin geometrik ortalaması olduğu saptanmıştır. Ayrıca qRT-PCR deneyleri sonucunda 3 miRNA'ya ait Ct değerlerinin gruplar arasındaki değişkenliğine bakılmıştır. RNU6 Ct değerlerinin 19.63-31.66, miR-23a Ct değerlerinin 20.79-30.33, miR-191 Ct değerlerinin 21.16-34.33 ve miR-23a ve miR-191 Ct değerlerinin geometrik ortalamasının 21.07-30.83 değerleri arasında değiştiği saptanmıştır (Şekil 5.6.). PZR analizlerinde referans olarak gruplar arasında en az değişkenlik gösteren ve Leitao ve ark. tarafından da önerilen kombinasyon olan miR-23a ve miR-191 miRNA'larına ait Ct değerlerinin geometrik ortalamasının referans değer olarak kullanılmasına karar verilmiştir (83).

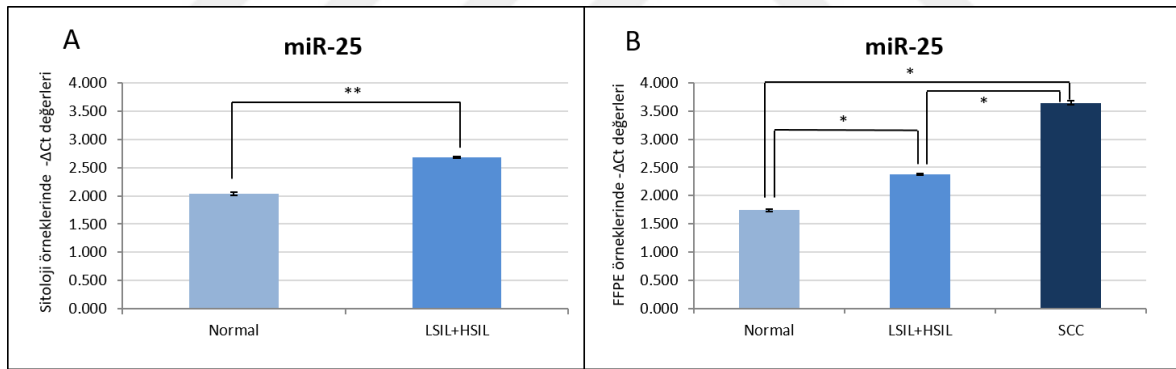


Şekil 5.6. Sitoloji örneklerinde tüm gruplara ait örnekler ile RNU6, miR-23a ve miR-191 primerleri kullanılarak yapılan qRT-PCR deneyleri sonucunda elde edilen ct değerlerinin dağılımına ait box-plot grafiği

### 5.2.2. SİTOLOJİ VE FFPE ÖRNEKLERİNDE MİRNA İFADELERİNE AİT QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI

İlk 10 meta-miRNA arasından rol aldığı biyolojik süreçler servikal kanserler ile ilişkili olabilecek ve hedefleri aynı sinyal yollarında rol oynayan miR-25, let-7i, miR-26a, miR-29a ve let-7d'nin bağımsız sitoloji ve FFPE örneklerindeki ifadeleri qRT-PCR analizi yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm örnekler sitolojik ve histolojik tanılarına göre gruplandırılmış ve normal örnekler iki örnek tipi için de kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

qRT-PCR analizleri sonucunda tüm diğer miRNA'lar arasında miR-25'in normal, pre-kanseröz lezyon ve SCC gruplarını birbirinden ayırma gücü en yüksek miRNA olduğu saptanmıştır. Hem sitoloji hem de FFPE örneklerinde birbiriyle uyumlu olarak normalden artan displazi derecesine ve tümöre doğru miR-25 ifadesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak her iki örnek tipinde de LSIL ve HSIL grupları arasında miR-25 ifadesi arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu iki grup bir arada intraepitelyal lezyon grubu olarak kabul edilerek yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise tüm grupların birbirinden anlamlı bir şekilde ayrıldığı belirlenmiştir (Şekil 5.7.).



Şekil 5.7. Sitoloji (A) ve FFPE (B) doku örneklerinde miR-25 ifadesinin gruplar arasındaki değişimi, Mann Whitney U, \*p

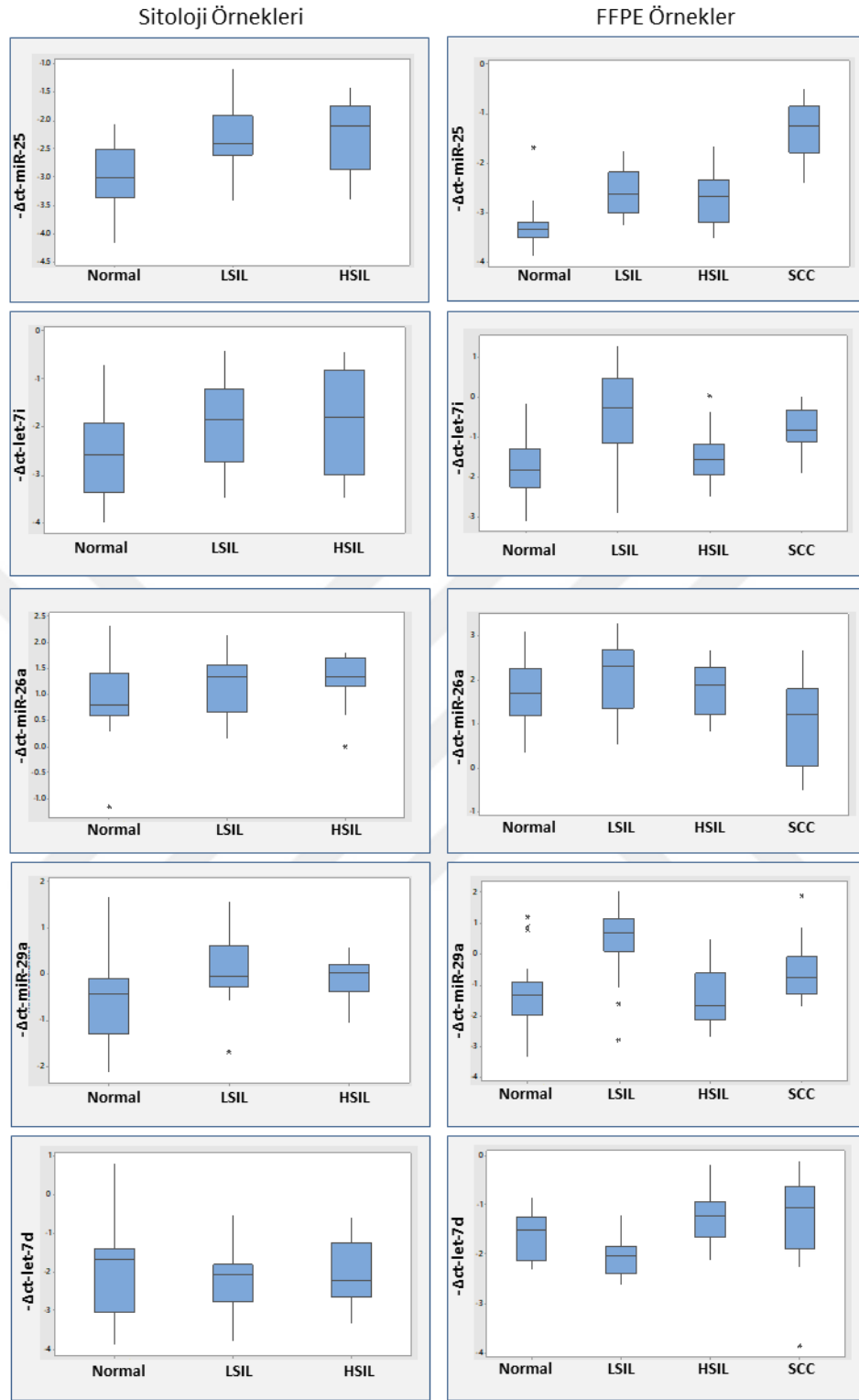
let-7i ve miR-29a normal ve LSIL gruplarını, LSIL düzeyindeki önemli derecedeki artışı sebebiyle iki örnek tipinde de istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde ayırabilmektedir. Ancak iki miRNA da LSIL ve HSIL gruplarını sitoloji örneklerinde ayıramazken, FFPE örneklerinde HSIL grubundaki ifade azalışı nedeniyle bu grupları ayırabilmektedir. Bunlara ek olarak let-7i ifadesi tümör örneklerinde normale göre önemli ölçüde artış göstermektedir.

Hem sitoloji hem de FFPE örneklerinde normal, LSIL ve HSIL grupları arasında miR-26a ifadesi yönünden hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Ancak miR-26a ifadesi FFPE örneklerinde SCC grubunda normale ve prekanseröz lezyonlara göre anlamlı bir şekilde azalmaktadır.

let-7d ifadesi ise her iki örnek tipinde de gruplar arasında anlamlı bir şekilde farklılık göstermezken, FFPE örneklerinde normalden tümöre doğru bir artış paterni olduğu görülmektedir.

Tüm bu bulgular sonucunda sitoloji örnekleri ve FFPE örnekleri arasında miRNA ifadeleri yönünden gruplar arasında aynı yönlü değişimler olduğu ve istatistiksel analiz sonuçlarının birkaç farklılık dışında aynı olduğu dikkati çekmektedir (Şekil 5.8.) (Çizelge 5.7.)(Çizelge 5.8.).





Şekil 5.8. miR-25, let-7i, miR-26a, miR-29a ve let-7d ifadelerinin sitoloji ve FFPE örneklerinde normal, LSIL, HSIL ve SCC grupları arasında ifade değişimlerine ait box-plot grafikleri

Çizelge 5.7. Sitoloji örnekleri ile yapılan qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen değerlere ait istatistik sonuçları ( $p \leq 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir)

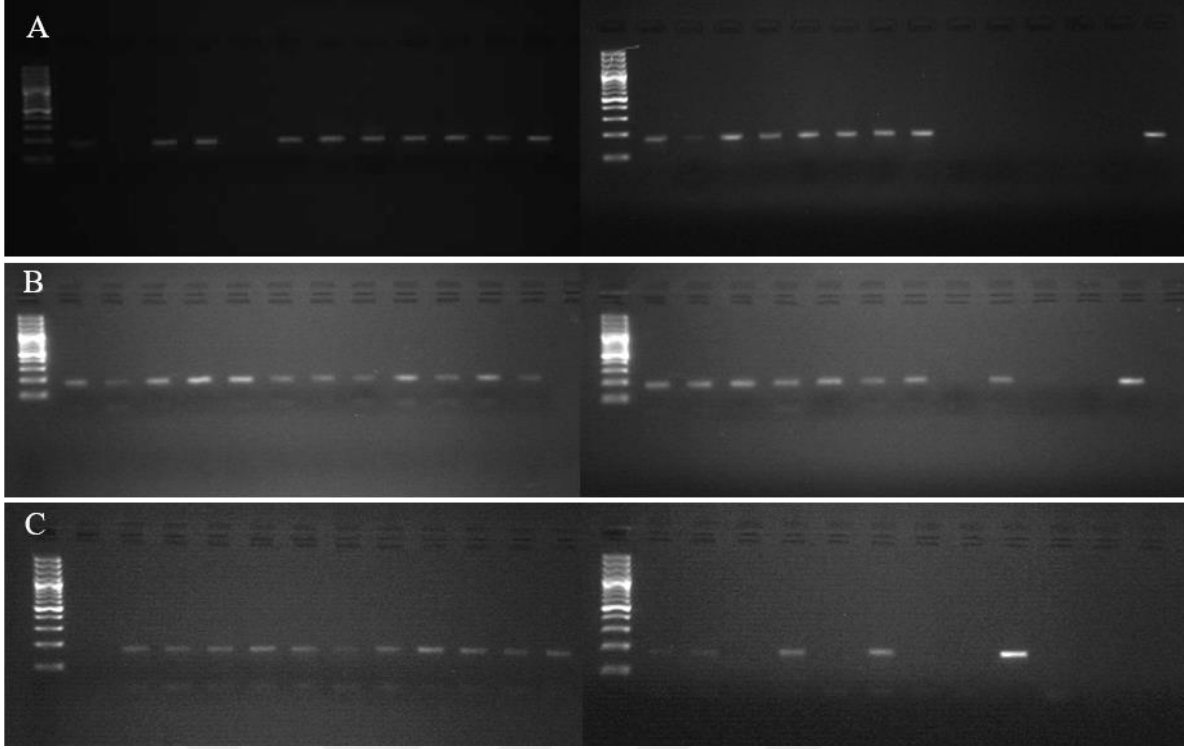
| Gruplar<br>p değeri | miR-25 | let-7i | miR-26a | miR-29a | let-7d |
|---------------------|--------|--------|---------|---------|--------|
| Normal-LSIL         | 0.002  | 0.043  | 0.587   | 0.014   | 0.731  |
| Normal-HSIL         | 0.003  | 0.078  | 0.172   | 0.187   | 0.911  |
| LSIL-HSIL           | 0.993  | 0.987  | 0.760   | 0.600   | 0.946  |

Çizelge 5.8. FFPE doku örnekleri ile yapılan qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen değerlere ait istatistik sonuçları ( $p \leq 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir)

| Gruplar<br>p değeri | miR-25 | let-7i | miR-26a | miR-29a | let-7d |
|---------------------|--------|--------|---------|---------|--------|
| Normal-LSIL         | 0.000  | 0.000  | 0.337   | 0.000   | 0.158  |
| Normal-HSIL         | 0.003  | 0.710  | 0.979   | 0.991   | 0.097  |
| LSIL-HSIL           | 0.935  | 0.000  | 0.566   | 0.000   | 0.000  |
| Normal-SCC          | 0.000  | 0.002  | 0.033   | 0.121   | 0.244  |
| LSIL-SCC            | 0.000  | 0.495  | 0.000   | 0.048   | 0.001  |
| HSIL-SCC            | 0.000  | 0.045  | 0.012   | 0.064   | 0.986  |

### 5.2.3. SİTOLOJİ ÖRNEKLERİ MRNA DENEYLERİ İÇİN SENTEZLENEN CDNA'LARIN KONTROLÜNE AİT KLASİK PZR SONUÇLARI

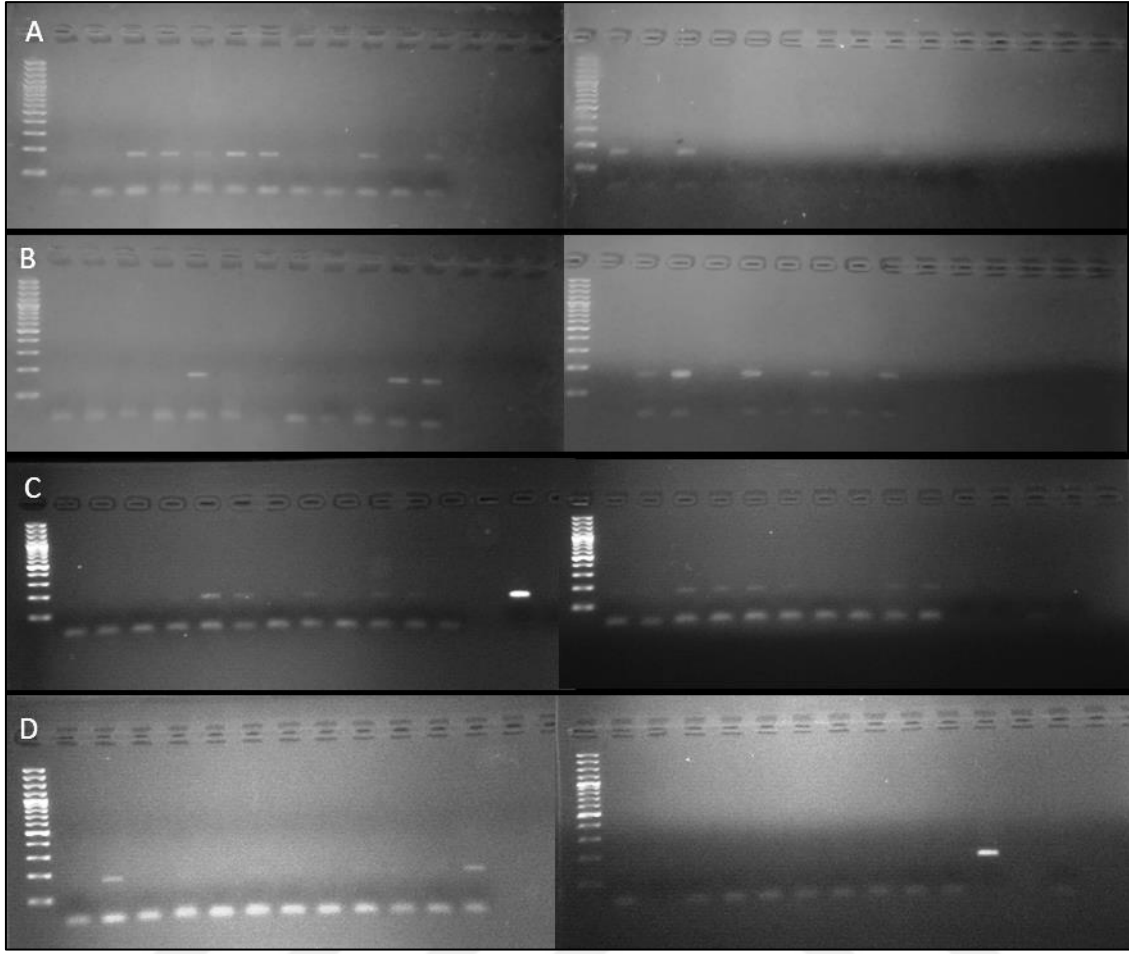
miRNA analizlerinde kullanılan örneklerle ait mRNA deneylerini gerçekleştirebilmek amacıyla aynı total RNA'lerden uygun kitler kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Örneklerle ait qRT-PCR analizlerine başlamadan önce sitoloji örneklerinin RNA kalitesinin düşük olması nedeniyle öncelikle klasik PCR yöntemiyle cDNA'ların çalışmaya uygunluğu test edilmiştir. GAPDH primeri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda oluşan ürünler ile jel elektroforezi yapılmış ve 18 normal, 20 LSIL ve 15 HSIL örneğinde bant varlığı saptanmıştır (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. Sitoloji örnekleri ile yapılan mRNA-cDNA'larının klasik PZR ürünlerine ait jel görüntüleri A) Normal grup B)LSIL grubu C)HSIL grubu

#### 5.2.4. FFPE ÖRNEKLERİ MRNA DENEYLERİ İÇİN SENTEZLENEN CDNA'LARIN KONTROLÜNE AİT KLASİK PZR SONUÇLARI

miRNA analizlerinde kullanılan örneklere ait mRNA deneylerini gerçekleştirebilmek amacıyla aynı total RNA'lardan uygun kitler kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Örneklerle ait qRT-PCR analizlerine başlamadan önce FFPE örneklerinin RNA kalitesinin düşük olması nedeniyle öncelikle klasik PCR yöntemiyle cDNA'ların çalışmaya uygunluğu test edilmiştir. GAPDH primeri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda oluşan ürünler ile jel elektroforezi yapılmış ve 8 normal, 7 LSIL, 10 HSIL ve 2 SCC örneğinde bant varlığı saptanmıştır (Şekil 5.10.).

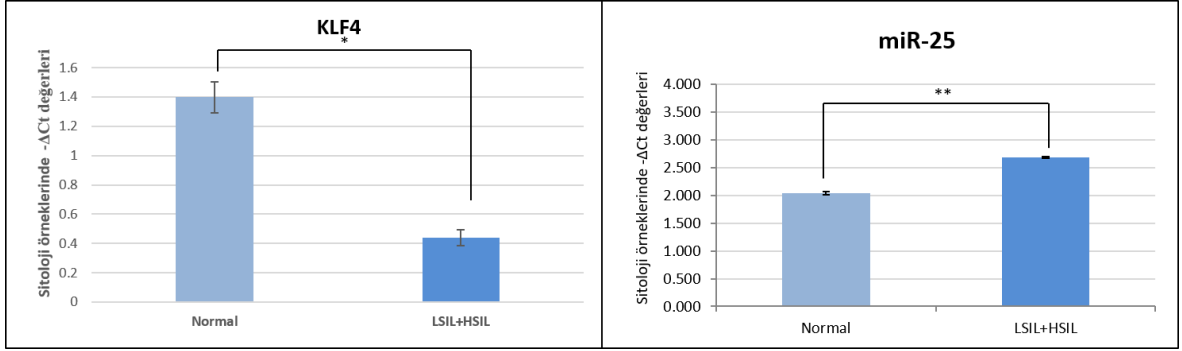


Şekil 5.10. FFPE örnekleri ile yapılan mRNA-cDNA'larının klasik PZR ürünlerine ait jel görüntüleri A) Normal grup B)LSIL grubu C)HSIL grubu D)SCC grubu

#### 5.2.5. SİTOLOJİ ÖRNEKLERİNDE MRNA İFADELERİNE AİT QRT-PCR ANALİZİ SONUÇLARI

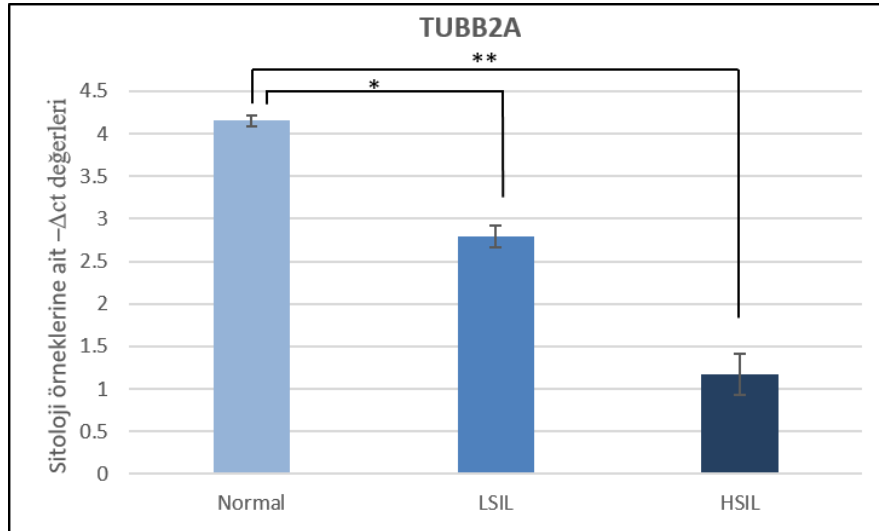
Klasik PZR deneyleri sonucunda çalıştığı saptanan örnekler ile qRT-PCR deneylerine devam edilmiştir. Sitoloji örnekleri ile KLF4 primeri kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR deneyleri sonucunda 11 normal, 9 LSIL ve 5 HSIL örneğinin çalıştığı belirlenmiş ve analizlere bu örnekler ile devam edilmiştir. Tüm gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler sonucunda hiçbir grup arasında anlamlı bir ifade farklılığı bulunmamıştır. Ancak LSIL ve HSIL grupları prekanseröz lezyon grubu olarak tek bir grup şeklinde normal örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde ifadesinde azalma olduğu saptanmıştır.

miR-25 hedefi olarak belirlemiş olduğumuz KLF4 ifadesi normalden HSIL'a doğru gidildikçe azalırken miR-25'in ifadesi artışı göstermiştir (Şekil 5.11.).



Şekil 5.11. Sitoloji örneklerinde KLF4 ve miR-25 ifadelerinin normal ve LSIL+HSIL gruplarındaki ifade düzeyleri, Mann Whitney U, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Sitoloji örnekleri ile TUBB2A primeri kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR deneyleri sonucunda ise 12 normal, 11 LSIL ve 6 HSIL örneğinin çalıştığı belirlenmiş ve analizlere bu örnekler ile devam edilmiştir. Tüm gruplar arasında yapılan istatistiksel analizler sonucunda normal örneklerin hem LSIL hem de HSIL örneklerinden anlamlı bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. TUBB2A ifadesi normalden HSIL'a doğru gidildikçe azalmaktadır. (Şekil 5.12.).



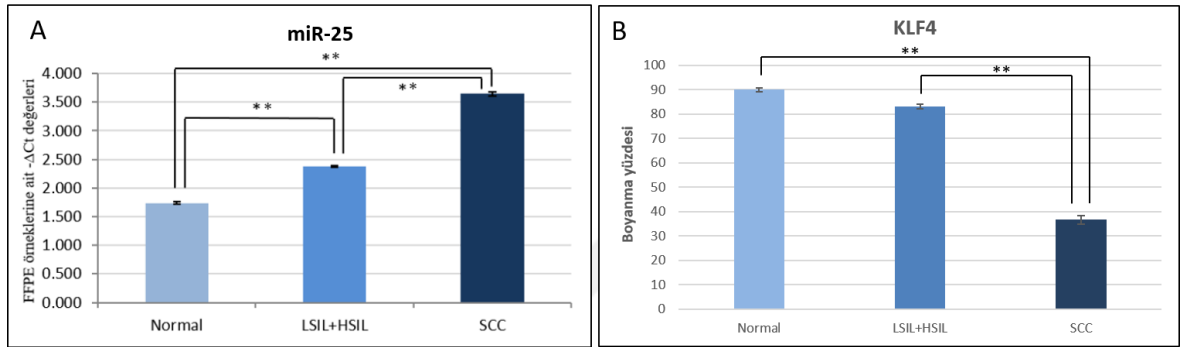
Şekil 5.12. Sitoloji örneklerinde TUBB2A'nın normal, LSIL ve HSIL derecelerindeki ifade düzeyi, Kruskal Wallis, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Klasik PZR deneylerinden elde edilen PZR ürünlerinin jel görüntülemesinde bant varlığı saptanmasına rağmen KLF4 ve TUBB2A primerleri ile yapılan qRT-PCR analizlerinde daha az sayıda örneğin çalıştığı görülmüştür. Diğer primerler ile yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda da tüm örneklerde ifadenin çok düşük olduğu ve teknik tekrarlar arasında büyük fark olduğu saptanmıştır ve analizlere devam edilememiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen bulgular ışığında; klasik PZR sonucunda jel görüntülemesinde sitoloji örneklerine göre daha zayıf ve az bant varlığı saptanan FFPE örnekleri ile mRNA deneyleri yapılamamıştır. Sitoloji örneklerinde ise diğer kalan beş miRNA hedefi için deneylere devam edilememiştir.

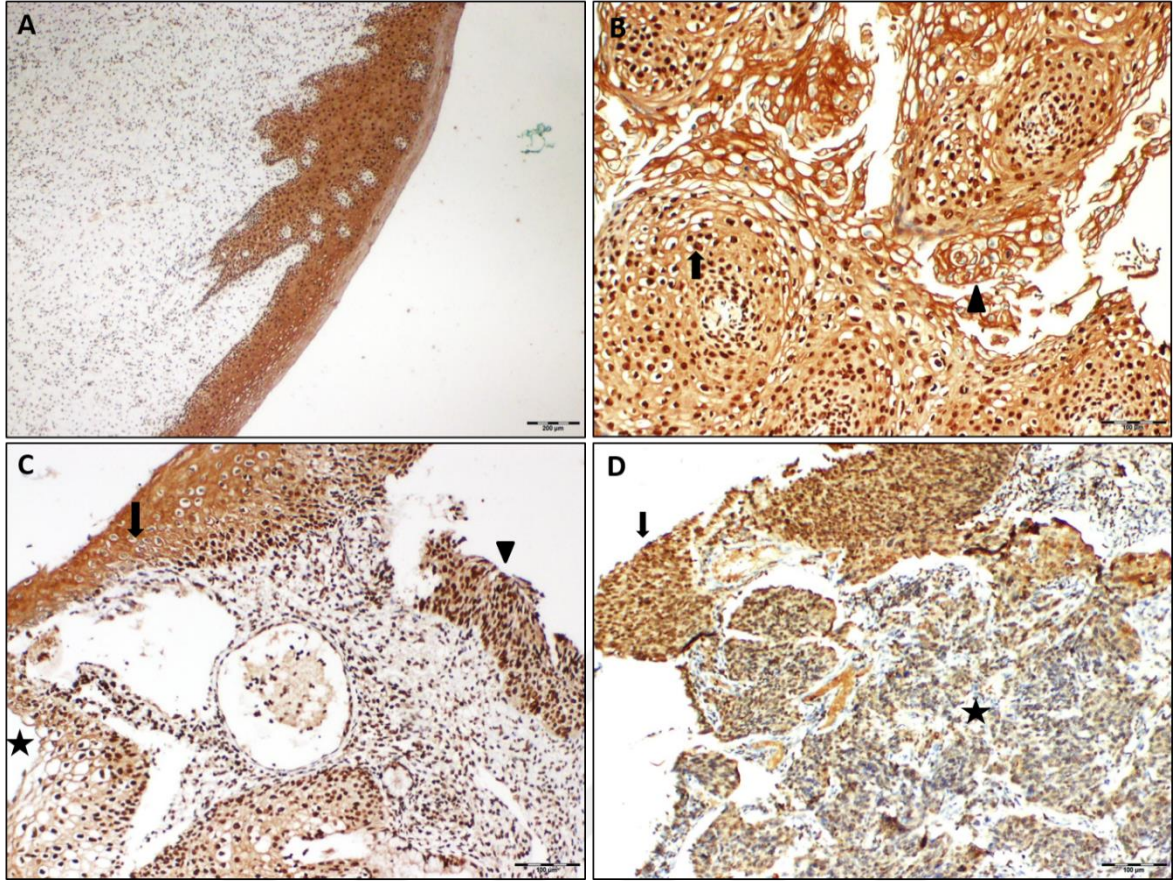
#### **5.2.6. KLF4 İFADESİNİN FFPE DOKULARDAKİ DEĞİŞİMİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bağımsız örnekler ile yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda normal, prekanseröz lezyonlar ve tümör grupları arasında sitoloji örnekleri ve FFPE örneklerinde diğer miRNA'lar arasında öne çıkan miR-25'in hedefi olan KLF4 proteininin sitoloji örneklerinde ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. Ancak teknik problemler nedeniyle bu proteinin ifade değişimi FFPE doku örneklerinde qRT-PCR metoduyla belirlenememiştir. Bu nedenle daha önce miRNA deneyleri için kullanılan FFPE örneklerine IHC metodu uygulanarak KLF4 ifadesinin normal, prekanseröz lezyonlar ve SCC örneklerindeki değişimi araştırılmıştır. Değerlendirmeler sırasında KLF4'ün epitel hücrelerdeki boyanma yüzdesi hesaplanmıştır. Bir transkripsiyon faktörü olan KLF4 için boyanma pozitifliği hücre çekirdeğindeki boyanma varlığı ile değerlendirilmiştir. Ancak IHC boyamaları sonucunda KLF4 boyanmasının epitel hücrelerde sadece nükleer değil sitoplazmik olarak da pozitif olduğu gözlenmiştir. KLF4 boyanma yüzdesi normal örneklerde %75 ve %100 arasında değişmektedir ve boyanma yüzde ortalamasının %90 olduğu saptanmıştır. Boyanma yüzdesi LSIL örneklerinde %20-100 aralığında, ortalama %72.7 ve HSIL örneklerinde ise %75-100 aralığında, ortalama %94.6 olarak bulunmuştur. Bu iki örnek grubu prekanseröz lezyonlar olarak tek grup altında incelendiğinde ise ortalama boyanma yüzdesi %83.2'dir. SCC örneklerine bakıldığında ise boyanma yüzdesinin normal ve prekanseröz lezyon grubundaki örneklerle göre dramatik biçimde azaldığı görülmüştür. SCC grubu içinde boyanma yüzdesi %0 ve %100 arasında değişmektedir ve ortalama boyanma yüzdesinin %36.7 olduğu saptanmıştır. IHC boyanmaları sonucunda sitoloji örneklerinde qRT-PCR analizlerinde

olduğu gibi KLF4 ifadesinin normalden prekanseröz lezyonlara ve ek olarak invaziv kanser grubuna doğru azaldığı gözlenmiştir. İstatistiksel analizler sonucunda da normal, prekanseröz lezyon ve SCC gruplarının birbirlerinden KLF4 ifadesi açısından anlamlı olarak ayrıldığı belirlenmiştir ( $p<0.01$ ). Sitoloji ve FFPE örneklerinde miR-25 ve KLF4 ifadelerinin gruplar arasında zıt yönlü olarak değiştiği dikkati çekmektedir (Şekil 5.13.). Normal, LSIL, HSIL ve SCC olgularındaki boyanmaya ait örnek mikroskopik görüntüler Şekil 5.14.’de sunulmuştur.



Şekil 5.13. MiR-25 ve KLF4 ifadelerinin FFPE doku örneklerindeki farklı gruplara göre değişimleri. A. MiR-25 ifadesi normalden prekanseröz lezyonlara ve daha sonra da SCC’ye doğru artmaktadır. Sonuçlar grup ortalamalarını ve SEM değerlerini göstermektedir. Normal örnekler için n=22, LSIL+HSIL grubu için n=42 ve SCC grubu için n=18’dir, Kruskal Wallis,  $**P<0.01$ . B. Normalden invaziv karsinoma doğru gidildiçe KLF4 boyanmasında anlamlı şekilde kayıp görülmektedir. Sonuçlar Normal, prekanseröz ve SCC gruplarında KLF4 antikoru ile pozitif boyanma gösteren hücrelere ait ortalama yüzde ve SEM değerlerini göstermektedir. Normal örnekler için n=17, LSIL+HSIL grubu için n=25 ve SCC grubu için n=17’dir, Kruskal Wallis,  $**P<0.01$



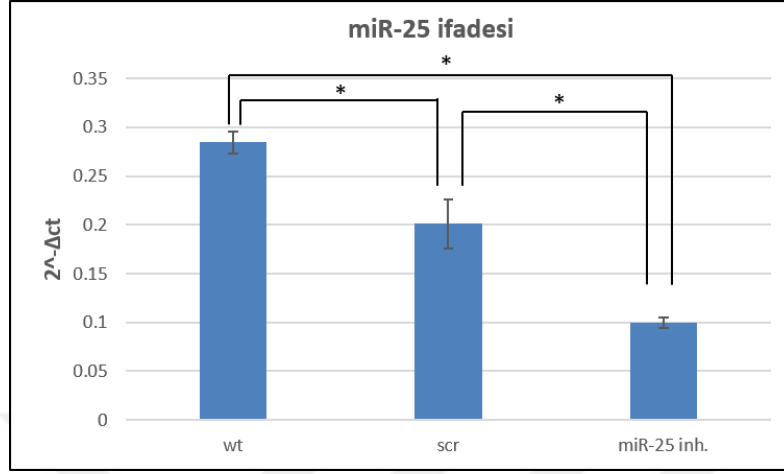
Şekil 5.14. FFPE doku örneklerinde farklı gruplardaki KLF4 boyanmasına ait örnek fotomikrograflar. **A.** Normal serviks epitelinde diffüz ve kuvvetli nükleer ve sitoplazmik KLF4 boyanması görülmektedir. **B.** LSIL hücrelerinde hem KLF4 boyanmasında kayıp (▲) hem de kuvvetli boyanma (↑) görülmektedir. **C.** LSIL hücrelerinde KLF4 boyanmasında kayıp (↓) ve kuvvetli boyanma (★), HSIL hücrelerinde ise kuvvetli boyanma (▼) görülmektedir. **D.** HSIL hücrelerinde kuvvetli nükleer boyanma görülürken (↓), SCC hücrelerinde boyanma kaybı (★) dikkati çekmektedir

## 5.2.7. *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR

### 5.2.7.1. MİR-25'İN HELA HÜCRELERİNDE KLF4 PROTEİN DÜZEYİ, PROLİFERASYON VE MOTİLİTE ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

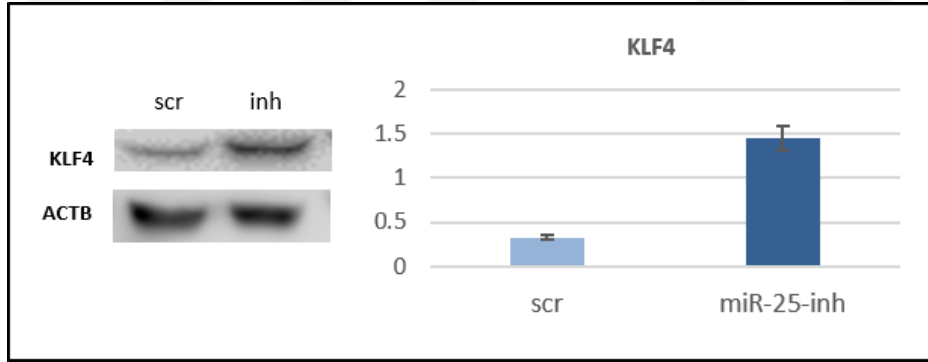
Biyoinformatik analizler ve bağımsız örnekler ile yapılan ifade analizleri sonucunda miR-25 ifadesinin normalden, prekanseröz lezyonlara ve invaziv karsinoma doğru gidildikçe arttığı ve hedefi olan KLF4 proteini ifadesinin ise azaldığı gözlenmiştir. Bu miRNA'nın tümör hücrelerinde ifadesini azaltmanın tedavi için yardımcı olabileceği düşünülerek HPV

pozitif bir servikal kanser hücre hattı olan HeLa hücrelerinde inhibitör transfeksiyonu ile miR-25 ifadesi azaltılarak (Şekil 5.15.) hem hedefi olan KLF4 ifadesindeki değişim hem de hücre proliferasyonu ve motilitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.



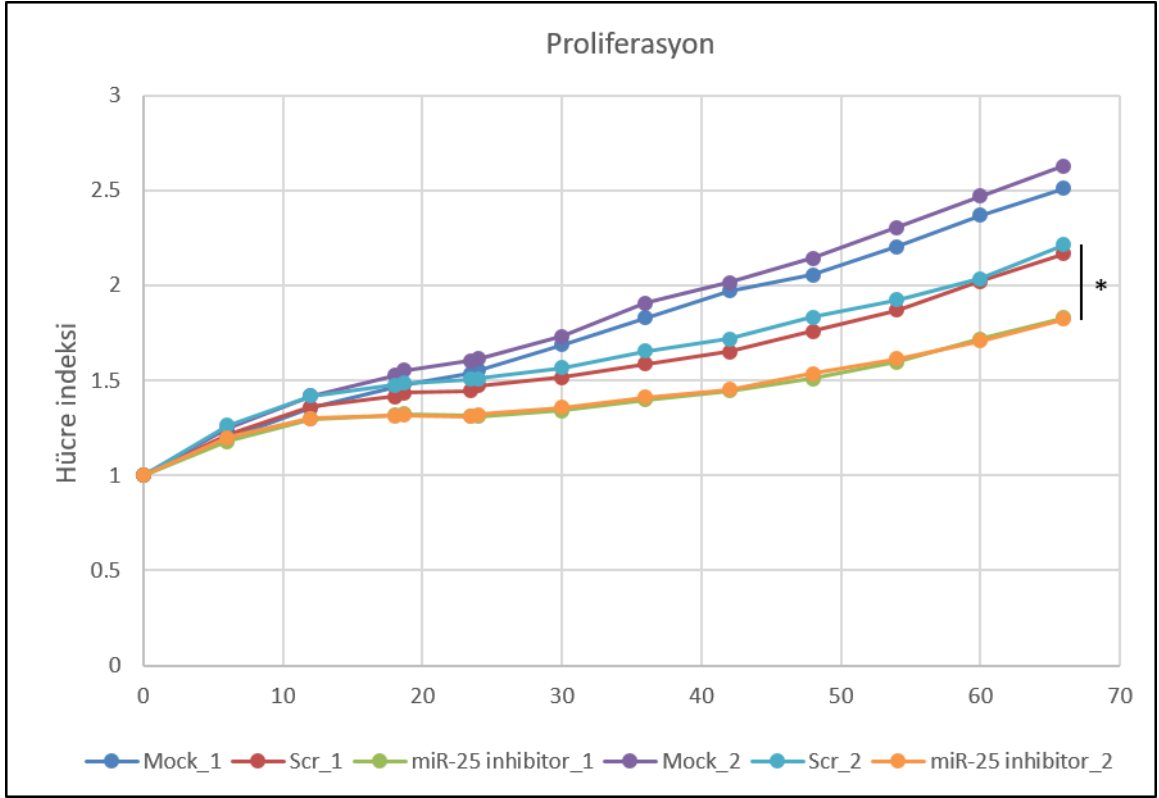
Şekil 5.15. İnhibitör ile transfeksiyon sonrasında miR-25 ifadesinde artış görülmüştür

Transfeksiyon sonrasında HeLa hücrelerinde KLF4 ifadesinin değişimine bakıldığında inhibitör uygulanan hücrelerde scrambled kontrole göre ifadenin arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.16.).



Şekil 5.16. HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonunun KLF4 protein düzeyi üzerine etkisi. MiR-25 inhibitörü ile transfeksiyon sonrasında yapılan western blot analizinde KLF4 protein seviyesinin arttığı görülmektedir (n=2)

Bir onkomir olarak kabul edilen miR-25 ifadesinin HeLa hücrelerinde inhibisyonu sonrasında yapılan proliferasyon deneylerinde inhibitör uygulanan hücrelerde proliferasyonun anlamlı biçimde azaldığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ ) (Şekil 5.17.).



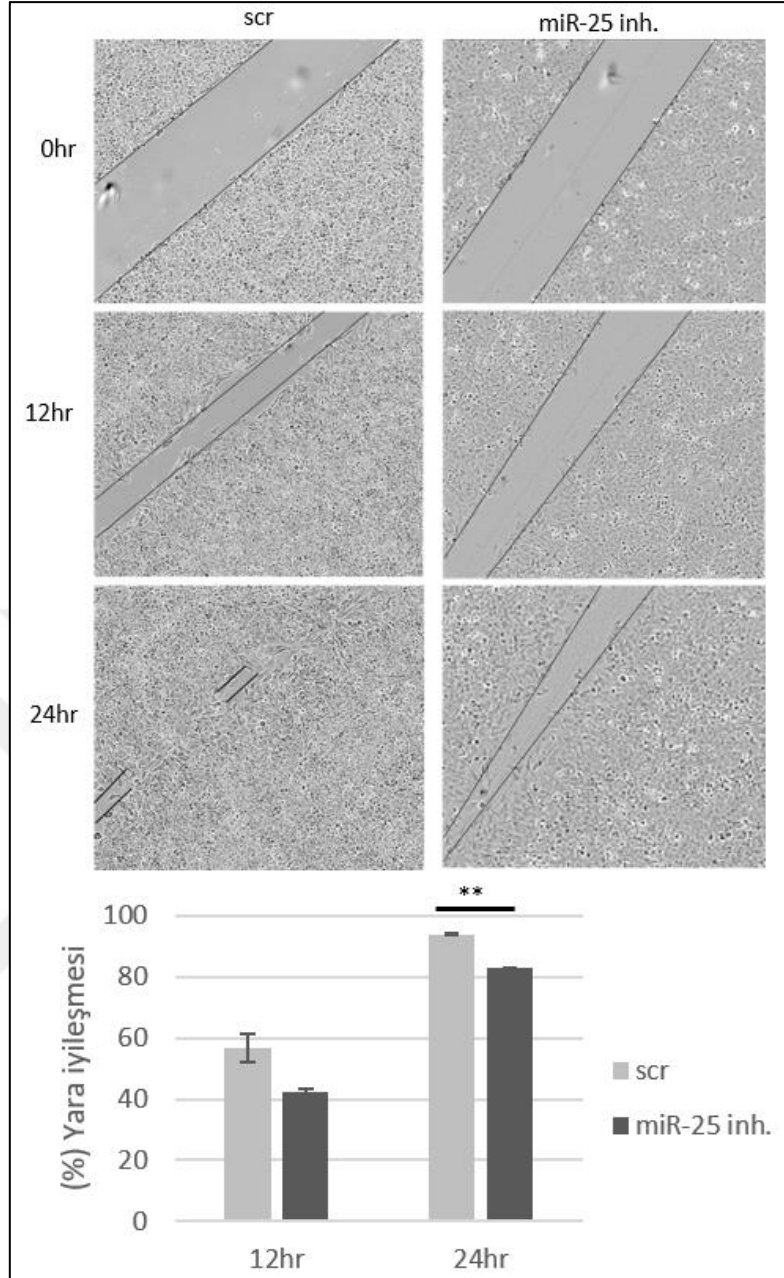
Şekil 5.17. HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonunun proliferasyon üzerine etkisi. miR-25 inhibitörü transfekte edilmiş hücrelerde negatif kontrole göre proliferasyonun anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir (n=2, \*p<0.01)

MiR-25'in hedefleri olan genler ile yapılan sinyal yolağı zenginleştirme analizlerine ait sonuçlar incelendiğinde fokal adezyon, fosfotidilinositol sinyal sistemi gibi hücre motilitesini etkileyebilecek bazı sinyal yolaklarının öne çıktığı dikkati çekmiştir (Çizelge 5.9.).

Çizelge 5.9. miR-25 hedefleri ile yapılan zenginleştirme analizi sonuçları

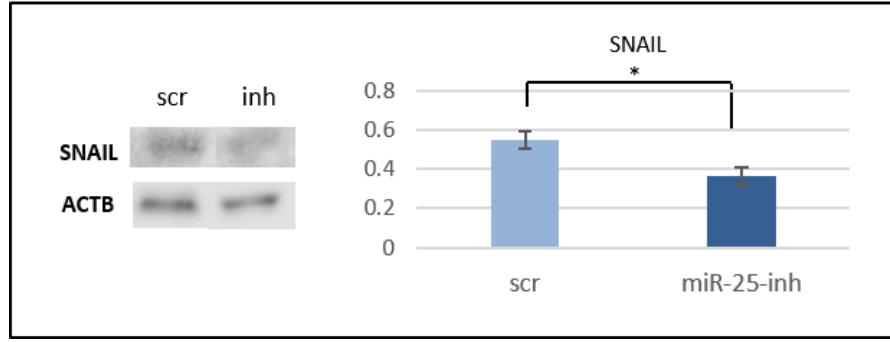
| Yolak ismi                            | Gen sayısı | P değeri   |
|---------------------------------------|------------|------------|
| Aktin sitoskeleti düzenlenmesi        | 213        | 0.00010806 |
| Fokal adezyon                         | 199        | 0.00041577 |
| FoxO sinyal yolağı                    | 132        | 0.00052295 |
| cAMP sinyal yolağı                    | 199        | 0.0011793  |
| Fosfotidilinositol sinyal sistemi     | 99         | 0.0018841  |
| İnsülin direnci                       | 107        | 0.0033527  |
| İnositol fosfat metabolizması         | 74         | 0.0034670  |
| Epitelyal hücrelere bakteri invazyonu | 74         | 0.0034670  |
| Otofaji                               | 128        | 0.0041014  |

Bu sebeple miR-25 inhibitörü ile transfekte edilmiş HeLa hücreleri ile WHA deneyleri yapılmıştır. Hücreler 24 saat boyunca izlenmiş ve 12. ve 24.saatlerde inhibitör ve scrambled kontrol uygulanan hücrelerin arasında oluşturulan boş alanın kapanma yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Bu deneyler sonucunda miR-25 ifadesindeki inhibisyonun hücrelerin motilitesini anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir (Şekil 5.18.).



Şekil 5.18. HeLa hücrelerinde miR-25'in motilite üzerinde etksi. Motilite hızının değerlendirilmesinde WHA kullanılmıştır. Hücreler arasındaki karşılaştırılacak olan boşluklar aynı genişliktedir ( $440 \pm 5$ ) ve miR-25 transfekte edilmiş hücrelerde kontrole göre motilite hızı azalmıştır ( $n=2$ , t test,  $**p < 0.01$ )

Bunlara ek olarak hücre motilitesinde düzenleyici bir rol oynayan SNAIL proteinin inhibitör uygulanmış hücrelerdeki ifade değişimine bakıldığında da SNAIL ifadesinin inhibitör uygulanmış hücrelerde scrambled uygulanan hücrelere göre anlamlı bir şekilde azaldığı saptanmıştır (Şekil 5.19.).



Şekil 5.19. HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonunun SNAIL protein düzeyi üzerine etkisi. MiR-25 inhibitörü ile transfeksiyon sonrasında yapılan western blot analizinde SNAIL protein seviyesinin azaldığı görülmektedir (n=3, t-test, \*p<0.05)

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. TARTIŞMA

MiRNA'ların kanser oluşum ve gelişimindeki rollerinin anlaşılması ve moleküler yöntemlerin gelişmesiyle birlikte birçok kanser tipine özgül miRNA'ların tanımlanabilmesi, yeni ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacıyla birçok araştırma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir. Kadınlar arasında yaygın olarak görülen ve mortalite oranı yüksek bir kanser türü olan servikal kanserler için 2008 yılında erken evre invaziv servikal kanser durumunda normal örneklerle göre ifadesi değişen miRNA'lar araştırılmaya başlanmıştır (62). Pereira ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan çalışmada ilk olarak normal, intraepitelyal lezyonlar ve invaziv kanser durumunda ifadesi değişen miRNA'lar mikrodizin yöntemi kullanılarak belirlenmiştir(69). Daha sonraki yıllarda invaziv servikal kanser ve öncül lezyonların oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA'ların aydınlatılmasına yönelik çalışmalar artarak devam etmiştir. Servikal kanser basamaklarında değişen miRNA seviyelerinin saptanması konusunda yapılan bu çalışmalarda yaygın materyaller olarak FFPE dokular, frozen kesitler ve hücre kültürlerinin kullanıldığı görülmektedir (52)(63). 2014 yılında Tian ve ark. tarafından yapılan çalışmada ilk defa literatürdeki çalışmalar taranarak belirlenmiş 6 miRNA'nın ifadesi eksfoliy servikal hücreler kullanılarak araştırılmıştır (64). Daha sonra 2015 yılında 2 adet çalışmada 3 farklı miRNA'nın ifadelerinin değişimi farklı lezyon derecelerinde servikal sitoloji örnekleri kullanılarak araştırılmıştır (54)(65). Son olarak 2018'de Kawai ve ark. tarafından yapılan çalışmada normal, intrapitelyal lezyon ve invaziv tümör kategorilerindeki servikal sitoloji örnekleri ile her bir kategori için bir RNA havuzu oluşturularak yapılan mikrodizin analizi ile potansiyel miRNA'lar ortaya çıkarılmıştır (66). Literatürde servikal kanser oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA'lar ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen şuana kadar tanı ve tedavi için kabul edilmiş spesifik bir miRNA bulunmamaktadır. Aynı zamanda servikal sitoloji örnekleri kullanılarak yapılan araştırmalar çok az sayıdadır. Bu tez çalışmasında hem biyoinformatik ve laboratuvar yöntemleri bir arada kullanılarak, hem de servikal sitoloji ve servikal biyopsi örnekleri bir arada kullanılarak geniş çaplı bir araştırma gerçekleştirilerek literatüre katkı sağlamak hedeflenmiştir.

## ***Meta-analiz ve biyoinformatik analizler***

Bu tez çalışmasının ilk basamağında bir meta analiz uygulaması yapılmıştır. Meta-analiz, birçok veriyi istatistiksel analizler kullanarak bir araya getiren bir yöntemdir. Literatüre bakıldığında servikal kanserler ile yapılan herhangi bir meta-analiz çalışması bulunmamaktadır. Sadece literatürde yapılan çalışmaları bir araya getiren ve derleme çalışması olarak sunulmuş bir entegrasyon çalışması mevcuttur (51). Bu tez çalışmasının ilk aşamasında literatürdeki mikrodizin çalışmalarına ait veriler birleştirilerek daha önce grubumuz tarafından geliştirilen ve meme kanseri sürecini araştırmak için kullanılan ANOVA bağımlı ve sıralama tabanlı bir meta analiz aracı ve biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak serviks kanserinin oluşum ve gelişiminde rol alan miRNA ve hedeflerinin ortaya çıkarılması, tanı ve tedavi sürecinde hedef olabilecek biyobelirteçlerin tanımlanması hedeflenmiştir (76). Bu analizler ile farklı platformlarla ve örneklerle yapılan çalışmalara ait ham veriler bir araya getirilmiş, analize sokulan örneklem sayısı arttırılmış, bağımsız örneklerde doğrulama çalışmalarına geçilmeden önce daha genel bir bakış açısı kullanılarak normal örnekler ve lezyon dereceleri arasında ifadesi değişen potansiyel biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bunlara ek olarak karşılaştırma analizleri ile yine farklı çalışmalara ait veriler bir araya getirilerek servikal kanser sürecinde ifadesi değişen mRNA'lar araştırılmıştır. Daha sonra biyoinformatik analizlere devam edilmiş, meta-analiz sonucunda ifadesi değiştiği saptanan miRNA'ların hedefleri ile karşılaştırma analizi sonucunda bulunan mRNA listeleri kesiştirilerek miRNA ve mRNA hedef listeleri oluşturulmuştur. Bu listelerdeki en güçlü biyobelirteç adaylarını seçebilmek ve bulunan miRNA ve mRNA hedeflerinin biyoinformatik doğrulamalarını yapabilmek amacıyla birçok farklı biyoinformatik araç ve analiz bir arada kullanılmıştır. İlk 10 meta-miRNA hedeflerinin hangi sinyal yolaklarında ortak olarak görev yaptığını bulmak amacıyla sinyal yolağı zenginleştirme analizleri yapılmıştır. Sinyal yolağı analizi sonuçlarında 5 adet meta-miRNA'nın (miR-25, let-7i, miR-26a, miR-29a, let-7d) hiyerarşik sınıflamada diğerlerinden ayrıldığı, servikal kanser oluşum ve gelişiminde önemli olabilecek viral karsinogenez, p53 sinyal yolağı, hücre döngüsü, ECM-reseptör etkileşimi ve adherens bağlantılar gibi yolaklarda ortak olarak rol aldığı saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar ile virüs kaynaklı birçok karsinomun oluşumunda miRNA'ların önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (85). Servikal kanser oluşumunda da HPV'nin rolü oldukça önemlidir. Aynı zamanda bu virüsün etkilediği p53 sinyal yolağı ve hücre döngüsü yolakları

da servikal kanser oluşumunda başlıca etkilenen yolaklardır. Yapılan sinyal yolağı zenginleştirme analizlerinde meta-miRNA hedeflerinin viral karsinogenez, p53 ve hücre döngüsü yolaklarında zenginleşmesi çalışmamız açısından, ileri analizler ile araştırılacak miRNA'ların seçiminde oldukça yol gösterici olmuştur. Yapılan çalışmalarda miR-25 ifadesinin HPV ilişkili orofaringeal karsinomlarda normalden tümöre doğru arttığı ve miR-29a ifadesinin de disregüle olduğu gösterilmiştir (86)(87). Kumar ve ark.'larının yaptığı çalışmada ise miR-25'in direkt olarak HPV-iliskili karsinogenezlerde kilit rol oynayan p53'ün 3'UTR ucuna bağlanarak fonksiyonunu negatif olarak düzenlediği bulunmuştur (88). Bunlara ek olarak miR-25, let-7i ve let-7d'nin siklinleri ve siklin bağımlı kinazların ifadesini düzenleyerek mitojenik uyarıya ve senesensten kaçışa sebep olduğu, miR-26a'nın ise siklinleri baskıladığı ve kanser hücre proliferasyonunu düşürdüğü ortaya çıkarılmıştır (47). Analizler sonucunda öne çıkan diğer sinyal yolakları ise ECM-reseptör etkileşimleri ve adherens bağlantılarıdır. Bu yolaklar motilite, invazyon, metastaz ve epitelyal mezekimal dönüşüm gibi biyolojik olaylarda belirleyici rol oynamaktadırlar (89)(90)(91). Meta-miRNA hedeflerinin bu yolaklarda zenginleşmesi, seçilen miRNA'ların servikal kanser gelişiminde ve yayılımında önemli görevleri olabileceğini düşündürmektedir.

Kullanılan biyoinformatik araçlardan bir diğeri de TCGA veri platformudur. TCGA birçok farklı kanser tipine ait moleküler ve klinik veriler içeren bir bilgi kaynağıdır. Bu platformdaki veriler normal ve tümör örnekleri arasında ifadesi değişen biyomoleküllerin saptanmasında, biyobelirteçlerin tanımlanmasında ve sağ kalım analizlerinin yapılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (92)(93)(94). TCGA "CESC" veri seti çalışmamızda seçilen meta-miRNA'lar ve hedeflerinin normal ve servikal tümörlerdeki değişim paternlerinin belirlenmesinde, miRNA- hedef ilişkisinin ön görülmesinde, klinik öneminin araştırılmasında ve gerçekleştirilen qRT-PCR deney sonuçları ile karşılaştırma yapmak amacıyla kullanılmıştır.

### ***Servikal kanser oluşum ve gelişim sürecindeki aday meta-miRNA***

MiRNA ifadelerinin ölçümünde qRT-PCR analizleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu teknikte ifadesi araştırılan miRNA'lar için analizler yapılırken normalizasyon aşamasında kullanılacak miRNA'nın doğru seçilmesi sonuç verilerinin doğruluğu açısından kritik öneme sahiptir. MiRNA analizlerinde normalizasyon basamağında referans gen olarak en yaygın olarak kullanılan gen RNU6'dır. Ancak bu analizler yapılırken dokuya özgül

referans genlerin kullanılması gerekliliği birçok çalışma ile gösterilmiştir (95). Buna uygun olarak çalışmamızda qRT-PCR analizlerinde normalizasyon aşamasında kullanılacak genler için öncelikle literatür araştırması yapılmıştır. Leita ve ark. tarafından servikal kanser analizlerinde kullanılacak en uygun referans gen ve miRNA'nın araştırıldığı çalışmada RNU6'nın en geniş aralıkta değişiklik gösteren ct değerleriyle en kararsız gen olduğu, miR-191 ve miR-23a kombinasyonunun normalizasyon aşamasında kullanılacak en uygun miRNA'lar olduğu gösterilmiştir (83). Çalışmamızda qRT-PCR analizleri ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda da literatür ile benzer sonuçlar elde edilmiş, miR-191 ve miR-23a ct değerlerinin geometrik ortalamasının normalizasyon için en uygun değerler olduğu saptanmıştır.

Tezin ikinci aşamasında; biyoinformatik analizler ile belirlenen aday meta-miRNA'lar ve hedeflerinin serviks kanseri gelişim sürecindeki ifade durumlarını belirlemek amacıyla serviks kanseri araştırmalarında nadir olarak kullanılan servikal sitoloji örnekleri ve bu örneklerle ait sonuçların karşılaştırılması için tanı sürecinde altın standart olarak kabul edilen FFPE doku örnekleri kullanılmıştır. FFPE örnekleriyle yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda TCGA verileriyle uyumlu olarak meta-miRNA'lardan miR-25, let-7i ve let-7d ifadesinin tümör örneklerinde normal örneklerle kıyaslandığında ifadesinin arttığı, miR-26a ifadesinin ise azaldığı saptanmıştır. TCGA analizlerinde miR-29a ifadesinin tümöre doğru gidildikçe azaldığı görülmekle birlikte yapılan qRT-PCR analizlerinde normal ve tümör örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda miR-25'in hem sitoloji hem de FFPE doku örneklerinde intraepitelyal lezyon ve SCC gruplarını normal örneklerden ve birbirlerinden ayırma gücü en yüksek ve en göze çarpan biyobelirteç adayı olduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarla hepatoselüler karsinom, akciğer kanseri, gastrik kanserler, meme kanseri ve overyan karsinomda miR-25 ifadesindeki artışın onkojenik etkilere sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır (96). Sethi ve ark.'larının baş-boyun bölgesinde görülen SCC'ler hakkında hazırladığı derlemede miR-25 ifadesinin tümör durumunda arttığı raporlanmıştır (97). Serviks dokusu ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Normal ve SCC hastalarından alınan servikal frozen doku örnekleri ile yapılan çalışmalarda miR-25 ifadesinin tümör örneklerinde arttığı belirlenmiştir (62)(98). Wilting ve ark.'larının yaptığı araştırmada ise miR-25 ifadesinin HSIL ve tümör örneklerinde arttığı gösterilmiştir (68).

Wang ve ark.'ları miR-25 ifadesinin intraepitelyal lezyonlarda ve invaziv kanser durumunda arttığını saptamakla birlikte HPV E7 onkoproteini indüksiyonu ile de miR-25 ifadesinde artış meydana geldiğini göstermişlerdir (99). Bazı sirküler miRNA'ların serum örneklerindeki ifadelerinin araştırıldığı bir çalışmada ise servikal kanser hastalarına ait örneklerde miR-25 düzeyinin normal hastalarinkine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (100). Literatürdeki bulgularla benzer olarak deney bulgularımız miR-25 ifadesinin hem sitoloji örneklerinde normalden prekanseröz lezyonlara hem de FFPE doku örneklerinde bu değişimlere ek olarak invaziv kansere doğru arttığını göstermektedir. Tüm bu bulgular miR-25'in normal, intraepitelyal lezyonlar ve invaziv kanser örneklerini birbirinden ayırabilecek potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda çalışmamız; miR-25'in sitoloji örneklerinde gruplar arasındaki ifade değişimini, grupları birbirinden ayırma gücünü ve bu miRNA'nın bir biyobelirteç adayı olma potansiyelini gösteren ilk çalışmadır.

Let-7i ifadesinin değişimine bakıldığında; hem sitoloji hem de FFPE örneklerinde normal ve LSIL grupları arasında anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır. FFPE örneklerin de ise buna ek olarak invaziv tümör örneklerinde ifadesinin normal örneklere göre anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir. Wilting ve ark.'larının yaptığı çalışmada let-7i ifadesine ait ifade değişikliği erken evrede ifadesi değişmeye başlayıp ilerleyen süreçte artmaya devam eden miRNA'lar kategorisinde değerlendirilmiş ve SCC grubunda normal örneklere göre 1.32 kat artmış bir ifade farklılığı olduğu bildirilmiştir. Ancak HSIL ve SCC grupları arasında çok büyük bir ifade farklılığı saptamamışlardır (68). Tüm bu bulgular, let-7i 'nin HPV enfeksiyonuna karşı oluşturulan erken cevapta rol oynuyor olabileceğini ve daha sonra da invaziv süreçte etkili olabileceğini düşündürmektedir.

İfade değişimleri araştırılan diğer meta-miRNA'lardan miR-26a ve miR-29a ifadesinin literatüre bakıldığında yaygın olarak birçok tümör tipinde azaldığı görülmektedir (101)(102). Bu bilgilere paralel olarak Wang ve ark.'larının normal ve servikal kanser örneklerinde miR-26a ve miR-29a ifadelerini karşılaştırdıkları çalışmada bu miRNA'ların sadece normal örneklerde yüksek ifade seviyesi gösterdiğini saptamışlardır (103). Pereira ve ark.'larının yaptığı çalışmada da miR-26a ve miR-29a ifade düzeylerinin servikal prekanseröz lezyonlarda ve invaziv tümör durumunda normale göre azaldığı gösterilmiştir (69). Çalışmamızda yaptığımız qRT-PCR analizleri sonucunda sitoloji ve FFPE doku örneklerinde miR-26a ifadesi açısından intraepitelyal lezyon ve normal örnekler arasında

istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Ancak yapılan diğer çalışmalarla benzer olarak FFPE dokularda invaziv tümör örneklerinde normal ve prekanseröz gruptaki örneklerle göre miR-26a ifadesinin anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgulara göre; miR-26a'nın invaziv tümörlerin diğer örnek gruplarından ayrılmasına olanak sağlayan bir biyobelirteç adayı olabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan, literatürdeki bulguların aksine çalışmamızda miR-29a ifadesi açısından normal ve kanser örnekleri arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Let-7d ifadesinin sitoloji ve FFPE doku örneklerindeki değişimlerine bakıldığında ise literatür bulguları ile uyumlu şekilde gruplar arasında anlamlı bir ifade farklılığı olmadığı görülmüştür (68).

### ***Sitoloji ve FFPE örneklerinde miRNA ve mRNA stabilitesi***

Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda miRNA ifadelerinin sitoloji ve FFPE örneklerinde gruplar arasında genel olarak benzer şekilde değişim gösterdiği saptanmasına rağmen, bazı gruplar arasında iki farklı örnek tipinde miRNA ifadeleri açısından farklılıklar olduğu görülmüştür. FFPE doku örnekleri deneylerde kullanılmak üzere hazırlanırken çevre dokudan gelecek etkileri azaltmak amacıyla mikrodiseksiyon yöntemi kullanılmış, normal epitel, intraepitelyal lezyon bölgeleri veya invaziv tümörlü alan belirlenerek sadece bu alanlardaki hücreler ile deneylere devam edilmiştir. Ancak sitoloji örnekleri servikal skuamöz epitel hücreleri, inflamatuvar hücreler ve diğer hücrelere ait elemanların bir arada bulunduğu bir karışım halindedir. Bunlara ek olarak prekanseröz lezyon gruplarına ait örneklerde displazik hücrelerin yanı sıra normal skuamöz epitel hücreler de aynı solüsyonun içinde bulunmaktadır. Sitoloji ve FFPE örneklerinden alınan sonuçlardaki farkların temelini bu örnekleme farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu farklılıklara rağmen sitoloji örneklerinde gruplar arasında ifadesi değişerek öne çıkan miRNA'ların biyobelirteç olma potansiyellerinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

MiRNA'lar biyolojik süreçlerdeki tanımlanan çok önemli rolleri dışında aynı zamanda moleküler araştırmalar için oldukça uygun biyomoleküller olarak öne çıkmaktadırlar. Kan, diğer vücut sıvıları ve FFPE doku örnekleri gibi birçok farklı materyalle yapılan çalışmalarda miRNA'ların mRNA'lara göre oldukça kararlı moleküller oldukları ortaya konmuştur (104)(105)(106). Tez kapsamında RNA analizleri için kalite açısından zayıf örnekler olan sitoloji ve FFPE doku örnekleriyle yapılan PZR analizleri sonucunda literatürle

uyumlu olarak miRNA'ların mRNA'lardan daha kararlı moleküller olduğu saptanmıştır. Aynı örneklerde miRNA ifadeleri için yapılan qRT-PCR çalışmalarında sonuçlar analizler için oldukça uygun iken, mRNA ifadeleri için yapılan klasik ve qRT-PCR sonuçlarında analizler için örneklerin kalitesinin düşük olduğu görülmüş ve analizlerin yalnızca küçük bir kısmına devam edilebilmiştir. Bu bulgular sonucunda; miRNA'ların rutinde yaygın olarak kullanılan ancak klinik ve tanılama süreçlerinde moleküler analizler için uygun koşullar altında saklanamayan örneklerde bile oldukça kararlı ve güvenli biyobelirteç adayları oldukları saptanmıştır.

### ***miR-25 ve KLF4 ilişkisi***

Meta-miRNA'lar arasında öne çıkan miR-25'in hedefi olan ve biyoinformatik analizler sonucunda bağımsız sitoloji ve FFPE örneklerindeki ifadesi araştırılan KLF4 çinko parmak motifleri içeren bir transkripsiyon faktörüdür. KLF4 ifadesi, kök hücrelerin aktivitesi ve kanser durumunda transkripsiyonel seviyede KLF4 promotorundaki CpG adalarındaki hipermetilasyon veya histon proteinlerindeki metilasyon ile transkripsiyon sonrası seviyede ise miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Bu düzenleme birçok farklı sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmektedir (107). KLF4 ifadesi ve aktivitesi doku tipi, tümör tipi ve derecesine bağlı olarak kanser durumunda değişkenlik gösterebilir ve buna bağlı olarak tümör baskılayıcı ya da onkojenik olarak görev yapabilir (108). Ancak servikal kanserler de dahil olmak üzere birçok kanser türünde yaygın olarak tümör baskılayıcı olarak görev yapmaktadır (109). *In vivo* çalışmalar KLF4'ün deri epitelinde yüksek şekilde ifade olduğunu ve epidermal bariyerin sağlanmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir (110)(111). Çalışmamızda normal, prekanseröz lezyon ve tümör gruplarıyla ve meta-miRNA hedefleri ile yapılan biyoinformatik analizler sonucunda miR-25'in hedefi olan KLF4'ün potansiyel bir mRNA biyobelirteci olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, sitoloji örnekleri ile yapılan qRT-PCR analizleri ve FFPE doku örnekleriyle yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda da normalden invaziv kansere doğru artan miR-25 ifadesi ile ters yönlü olarak, literatür ile benzer şekilde KLF4 ifadesinin ve protein seviyesinin azaldığı saptanmıştır (109). Daha önce miR-25 ve KLF4 ilişkisi küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve solunum yolu düz kas hücreleriyle yapılan çalışmalarda gösterilmesine rağmen servikal kanserlerde daha önce raporlanmamıştır (112)(113). Bu sebeplerle bu tez çalışması, servikal kanserlerde miR-25 ve KLF4 ilişkisini gösteren ilk

çalışmadır. Çalışmanın son aşamasında ise miR-25'in KLF4 üzerindeki etkisinin *in vitro* olarak gösterilmesi, miR-25 ve KLF4'ün servikal kanser hücrelerinin proliferasyonu ve motilitesi üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi için HeLa hücreleri kullanılarak hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiştir. HeLa hücreleriyle yapılan *in vitro* çalışmalarda miR-25 inhibisyonu sonrasında KLF4 ifadesinde artış meydana geldiği saptanmıştır. Bu bulgular daha önce qRT-PCR deneyleri ile uyumlu olarak miR-25'in KLF4 ifadesini negatif yönde düzenlediğini desteklemektedir.

Literatüre bakıldığında, birçok çalışmada miR-25'in farklı genleri hedefleyerek birçok kanser türünde hücre proliferasyonunu ve motilitesini indüklediği gösterilmiştir (114)(115)(116). Buna ek olarak, Chen ve ark.ları KLF4'ün hücre döngüsünde görev alan genler ile yakın ilişkili olduğunu ve hücre proliferasyonunun inhibisyonunu indüklediğini göstermişlerdir (117). Ayrıca KLF4 ifadesinde görülen kaybın hücre proliferasyonunu arttırarak deride tümör oluşumuna neden olduğu raporlanmıştır (118). Tez kapsamında gerçekleştirilen deneyler sonucunda da, HeLa hücrelerinde miR-25 inhibisyonu sonrasında artan KLF4 ifadesi ile birlikte hücre proliferasyonunda ve motilitesinde azalma olduğu gözlenmiştir. miR-25'in hedeflerinin invazyonu destekleyen yollarda zenginleşmesi sonucunda, ifadesi KLF4 tarafından da negatif yönde düzenlenen, epitelyal-mezenkimal dönüşüm sürecinde ve metastazda önemli rol oynayan SNAIL proteininin transfeksiyon sonrasındaki ifadesi de araştırılmıştır (119)(120). Yapılan deneyler sonucunda literatür bulgularıyla uyumlu olarak miR-25 inhibisyonuyla birlikte artan KLF4 ifadesine zıt şekilde SNAIL ifadesinin azaldığı belirlenmiştir. *In vitro* deneylere ait bulguların servikal kanserlerde miR-25'in hücre proliferasyonu ve motilitesi üzerindeki düzenleyici etkisini açıklar nitelikte olabileceği düşünülmektedir.

## 6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında biyoinformatik ve laboratuvar teknikleri bir arada kullanılarak servikal kanser oluşum ve gelişiminde rol oynayan miRNA'lar ve hedefleri araştırılmıştır. Çalışma literatürdeki mikrodizin çalışmalarından elde edilen verilere genel bir bakış açısı sağlayan ve bir araya getiren bir meta-analiz yaklaşımının sonucunda ortaya çıkan aday miRNA'lar ve biyoinformatik çalışmalarla belirlenen hedeflerinin sitoloji örneklerinde araştırıldığı ve FFPE doku örnekleriyle doğrulandığı nadir çalışmalardan birisi olmuştur. Çalışma sonuçları

özellikle non-invaziv ve dünyada öncül lezyonların taranmasında yaygın olarak kullanılan PAP smear örneklerinin rutin değerlendirmesine ve HPV testlerine alternatif yaklaşımlar önerebilecek bir öneme sahiptir. Analizler sonucunda, miR-25 ve hedefi olan KLF4'ün servikal kanser oluşum ve gelişim sürecinde öne çıkan biyomoleküller oldukları saptanmıştır. Çalışma kapsamında, ilk defa miR-25'in sitoloji materyallerinde prekanseröz grupları normal örneklerden ayırma potansiyeli olan bir biyobelirteç adayı olduğu gösterilmiştir. Sitoloji ve FFPE örneklerindeki tutarlı ifade değişiklikleri ve birçok örnek tipindeki kararlı yapıları ile miRNA'ların servikal kanser öncüllerinin erken tanısında kullanılabilecek biyobelirteç adayları oldukları ortaya çıkarılmıştır. Sitolojik örnekler ile çalışmak ve bu örneklerde yapılan deneyler sonucunda biyomarker adayları belirlemek, sitolojik tanılamadaki zorlukların aşılması konusunda önemli bir basamak olmuştur. Bunlara ek olarak, miR-25 ve KLF4 ilişkisi servikal kanserlerde ilk defa gösterilmiştir ve yapılan *in vitro* deneyler ile bu moleküllerin hücre proliferasyonu ve motilitesi mekanizmalarında önemli görevleri olabileceği saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
2. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* [Internet]. 2019;393(10167):169–82. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32470-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X)
3. Small W, Bacon MA, Bajaj A, Chuang LT, Fisher BJ, Harkenrider MM, et al. Cervical cancer: A global health crisis. *Cancer.* 2017;123(13):2404–12.
4. Jenkins D. Histopathology and Cytopathology of Cervical Cancer. *Dis Markers* [Internet]. 2007;23(4):199–212. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2007/874795/abs/>
5. Prendiville W, Sankaranarayanan R. Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer. *IARC Tech Rep.* 2017;45.
6. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):215–22.
7. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci.* 2007;98(10):1505–11.
8. Münger K, Baldwin A, Edwards K, Nguyen C, Owens M, Huh K, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78(21):11451–60.
9. Soliman PT, Slomovitz BM, Wolf JK. Mechanisms of cervical cancer. 2004;1(2):253–8.
10. Thomison J, Thomas LK, Shroyer KR. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol.* 2008;39(2):154–66.

11. Waxman AG, Chelmow D, Darragh TM, Lawson H, Moscicki AB. Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Obstet Gynecol.* 2012;120(6):1465–71.
12. Lax S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica Adriat.* 2011;20(3):125–33.
13. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(1):11–22.
14. Nayar R, Wilbur DC, Solomon D. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. *Comprehensive Cytopathology.* 2008. 77–90 p.
15. Maniar K, Wei J. Pathology of Cervical Carcinoma. Vol. 2228, *The Global Library of Women's Medicine.* 2017. 1–68 p.
16. Tan SY, Tatsumura Y. George papanicolaou (1883–1962): Discoverer of the pap smear. *Singapore Med J.* 2015;56(10):586–7.
17. Löwy I. Cancer, women, and public health: the history of screening for cervical cancer. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos.* 2010;17(suppl 1):53–67.
18. Lundenberg G. The 1988 bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *Jama.* 1989;262(7):931–4.
19. Nayar R, Wilbur DC. The bethesda system for reporting cervical cytology: A historical perspective. *Acta Cytol.* 2017;61(4–5):359–72.
20. Lee KR, Ashfaq R, Birdsong GG, Corkill ME, McIntosh KM, Inhorn SL. Comparison of conventional Papanicolaou smears and a fluid-based, thin- layer system for cervical cancer screening. *Obstet Gynecol.* 1997;90(2):278–84.
21. Díaz-Rosario LA, Kabawat SE. Performance of a fluid-based, thin-layer Papanicolaou smear method in the clinical setting of an independent laboratory and an outpatient screening population in new England. *Arch Pathol Lab Med.*

- 1999;123(9):817–21.
22. Limaye Anjila Connor, Amsy J. Huang, Xiaohua Luff R. Comparative Analysis of Conventional Papanicolaou Test and a Fluid-Based Thin Layer Method. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:200–4.
  23. Zhu J, Norman I, Elfgren K, Gaberi V, Hagmar B, Hjerpe A, et al. A comparison of liquid-based cytology and Pap smear as a screening method for cervical cancer. *Oncol Rep.* 2007;18(1):157–60.
  24. Whitlock EP, Vesco KK, Eder M, Lin JS, Senger CA, Burda BU. Annals of Internal Medicine Review Liquid-Based Cytology and Human Papillomavirus Testing to Screen. *Ann Intern Med.* 2011;155(10):687–700.
  25. Massad LS, Einstein MH, Huh WK, Katki HA, Kinney WK, Schiffman M, et al. 2012 Updated Consensus Guidelines for the Management of Abnormal Cervical Cancer Screening Tests and Cancer Precursors. *J Low Genit Tract Dis.* 2013;17(5 SUPPL.1):1–27.
  26. Oriel JD, Almeida JD. Demonstration of virus particles in human genital warts. *Br J Vener Dis.* 1970;46(1):37–42.
  27. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977;78:1–30.
  28. Gissmann L, Hausen H Zur. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int J Cancer.* 1980;25(5):605–9.
  29. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, Zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(12 I):3812–5.
  30. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 1984;3(5):1151–7.

31. Tidy J.A, Mason P.W FP. A new and sensitive method of screening for human papillomavirus infection. 1989.
32. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virol J*. 2012;9(1):1–9.
33. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(1):1–17.
34. Zhou P, Sun XY, Davies H, Crawford L, Park D, Frazer IH. Definition of linear antigenic regions of the HPV16 L1 capsid protein using synthetic virion-like particles. *Virology*. 1992;189(2):592–9.
35. Thomas TL. Cancer Prevention: HPV Vaccination. *Semin Oncol Nurs* [Internet]. 2016;32(3):273–80. Available from: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
36. Lee, R. L. Feinbaum R, Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843–54.
37. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855–62.
38. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019;20(1):5–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
39. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522–31.
40. O’Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(AUG):1–12.

41. Kai ZS, Pasquinelli AE. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2010;17(1):5–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1762>
42. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;15(8):509–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3838>
43. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2011;12(2):99–110. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2936>
44. Shim J, Nam JW. The expression and functional roles of microRNAs in stem cell differentiation. *BMB Rep*. 2016;49(1):3–10.
45. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis. *Oncotarget*. 2015;6(11):8474–90.
46. Li Y, Kowdley K V. MicroRNAs in Common Human Diseases. *Genomics, Proteomics Bioinforma*. 2012;10(5):246–53.
47. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. Vol. 1812, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011. p. 592–601.
48. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer. *Cancer Res*. 2016;76(13):3666–70.
49. Banno K, Iida M, Yanokura M, Kisu I, Iwata T, Tominaga E, et al. MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment. *Sci World J*. 2014;2014.
50. Sharma G, Dua P, Agarwal SM. A Comprehensive Review of Dysregulated miRNAs Involved in Cervical Cancer. *Curr Genomics* [Internet]. 2014;15(4):310–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25132800>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4133953>

51. Li M-Y, Hu X-X. Meta-analysis of microRNA expression profiling studies in human cervical cancer. *Med Oncol* [Internet]. 2015;32(6):510. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25920605>
52. Pardini B, De Maria D, Francavilla A, Di Gaetano C, Ronco G, Naccarati A. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: A systematic review. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1–17.
53. Gerard J. Nuovo, MD\*, Xin Wu, MD, PhD†, Stefano Volinia, PhD\*,‡, Fengting Yan, MD, PhD\*, Gianpiero di Leva, PhD‡, Nena Chin, MD, PhD§, Alcina F. Nicol, PhD||, Jinmai Jiang P, Gregory Otterson, MD†, Thomas D. Schmittgen, PhD¶, and Carlo Croce M. Strong Inverse Correlation Between MicroRNA-125b and Human Papillomavirus DNA in Productive Infection. 2012;100(2):130–4.
54. Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, Loureiro J, Baldaque I, Medeiros R, et al. miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/304584/>
55. Chen J, Zhao K-N. HPV-p53-miR-34a axis in HPV-associated cancers. *Ann Transl Med*. 2015;3(21):331.
56. Campos-Viguri GE, Jiménez-Wences H, Peralta-Zaragoza O, Torres-Altamirano G, Soto-Flores DG, Hernández-Sotelo D, et al. miR-23b as a potential tumor suppressor and its regulation by DNA methylation in cervical cancer. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2015;10(1):42. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84948702845&partnerID=tZOtx3y1>
57. Au Yeung C, Tsang T, Yau P, Kwok T. Human papillomavirus type 16 E6 induces cervical cancer cell migration through the p53/microRNA-23b/urokinase-type plasminogen activator pathway. *Oncogene* [Internet]. 2011;30(21):2401–10. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/onc.2010.613>
58. Guan Y, Guo L, Zukerberg L, Rueda BR, Styer AK. MicroRNA-15b regulates

reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) expression in human uterine leiomyoma. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2016;14(1):45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530410>

59. Discacciati MG, Gimenes F, Pennacchi PC, Fai??o-Flores F, Zeferino LC, Derchain SM, et al. MMP-9/RECK imbalance: A mechanism associated with high-grade cervical lesions and genital infection by human papillomavirus and chlamydia trachomatis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(10):1539–47.
60. Kong Q, Wang W, Li P. Regulator role of HPV E7 protein on miR-21 expression in cervical carcinoma cells and its functional implication. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(12):15808–13.
61. Xu J, Zhang W, Lv Q, Zhu D. Overexpression of miR-21 promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells via the inhibition of PTEN. *Oncol Rep*. 2015;33(6):3108–16.
62. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, et al. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2008;14(9):2535–42.
63. Chen J, Yao D, Zhao S, He C, Ding N, Li L, et al. MiR-1246 promotes SiHa cervical cancer cell proliferation, invasion, and migration through suppression of its target gene thrombospondin 2. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;290(4):725–32.
64. Tian Q, Li Y, Wang F, Li Y, Xu J, Shen Y, et al. MicroRNA detection in cervical exfoliated cells as a triage for human papillomavirus-positive women. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(9).
65. Malta M, Ribeiro J, Monteiro P, Loureiro J, Medeiros R, Sousa H. Let-7c is a Candidate Biomarker for Cervical Intraepithelial Lesions: A Pilot Study. *Mol Diagnosis Ther*. 2015;19(3):191–6.
66. Kawai S, Fujii T, Kukimoto I, Yamada H, Yamamoto N, Kuroda M, et al. Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia. *Sci Rep*. 2018;8(1).

67. Mo W, Tong C, Zhang Y, Lu H. microRNAs' differential regulations mediate the progress of Human Papillomavirus (HPV)-induced Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN). BMC Syst Biol [Internet]. 2015;9:4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889737><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4337110>
68. Wilting SM, Snijders PJF, Verlaet W, Jaspers a, van de Wiel M a, van Wieringen WN, et al. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. Oncogene [Internet]. 2013;32(1):106–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330141>
69. Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos MAS. Microrna expression variability in human cervical tissues. PLoS One. 2010;5(7).
70. den Boon JA, Pyeond D, Wang SS, Horswilla M, Schiffmanf M, Shermanf M, et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(25):E3255–64.
71. Caffarel MM, Chattopadhyay A, Araujo AM, Bauer J, Scarpini CG, Coleman N. Tissue transglutaminase mediates the pro-malignant effects of oncostatin M receptor over-expression in cervical squamous cell carcinoma. J Pathol. 2013;231(2):168–79.
72. Luigi Scotto,<sup>1†</sup> Gopeshwar Narayan,<sup>1†,‡</sup> Subhadra V. Nandula,<sup>1†</sup> Hugo Arias-Pulido,<sup>2,3</sup> Shivakumar Subramaniyam,<sup>1</sup> Achim Schneider,<sup>4</sup> Andreas M. Kaufmann,<sup>4</sup> Jason D. Wright,<sup>5</sup> Bhavana Pothuri,<sup>5</sup> Mahesh Mansukhani <sup>1</sup> and Vundavalli V. Murty. Identification of Copy Number Gain and Overexpressed Genes on Chromosome Arm 20q by an Integrative Genomic Approach in Cervical Cancer: Potential Role in Progression. Genes Chromosomes Cancer. 2008;47(October 2013):238–46.
73. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3-new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res. 2012;40(15):1–12.
74. Edgar R. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array

- data repository. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002;30(1):207–10. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/30.1.207>
75. Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, Emam I, et al. ArrayExpress update-trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(D1):987–90.
  76. Oztemur Y, Bekmez T, Aydos A, Yulug IG, Bozkurt B, Dedeoglu BG. A ranking-based meta-analysis reveals let-7 family as a meta-signature for grade classification in breast cancer. *PLoS One*. 2015;10(5):1–16.
  77. Hicks SC, Irizarry RA. quantro: A data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method. *Genome Biol* [Internet]. 2015;16(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0679-0>
  78. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W460–6.
  79. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019 : gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. 2019;47(May):199–205.
  80. Goldman M, Craft B, Hastie M, Repečka K, Kamath A, McDade F, et al. The UCSC Xena platform for cancer genomics data visualization and interpretation. *bioRxiv* [Internet]. 2019;(Schroeder 2015):326470. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/326470v5>
  81. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO BD. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14863–8.
  82. Saldanha AJ. Java Treeview - Extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3246–8.
  83. Leitão M da CG, Coimbra EC ampos, de Lima R de CP, Guimarães M de L, Heráclio S de A, Silva Neto J da C, et al. Quantifying mRNA and microRNA with qPCR in cervical carcinogenesis: a validation of reference genes to ensure accurate

- data. PLoS One. 2014;9(11):e111021.
84. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004;64(15):5245–50.
  85. Vojtechova Z, Tachezy R. The role of miRNAs in virus-mediated oncogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
  86. Hui ABY, Lin A, Xu W, Waldron L, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, et al. Potentially prognostic miRNAs in HPV-associated oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19(8):2154–62.
  87. Božinović K, Sabol I, Dedio I, Milutin Gašperov N, Manojlović S, Vojtechova Z, et al. Genome-wide miRNA profiling reinforces the importance of miR-9 in human papillomavirus associated oral and oropharyngeal head and neck cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–13.
  88. Munish Kumar, Zhongxin Lu, Apana Agha L. Takwi, Weiqun Chen, Natalie S. Callander, Kenneth S. Ramos, Ken H. Young and YL. Negative Regulation of the Tumor Suppressor p53 Gene by MicroRNAs. *Oncogene.* 2011;30(7):843–53.
  89. He X, Lee B, Jiang Y. Cell-ECM interactions in tumor invasion. *Adv Exp Med Biol.* 2016;936(November 2017):73–91.
  90. Knights AJ, Funnell APW, Crossley M, Pearson RCM. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Res [Internet].* 2012;8(Table 1):61–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23450077><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3582402>
  91. Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD. The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adhes Migr.* 2012;6(4):365–73.

92. Liu J, Lichtenberg T, Hoadley KA, Poisson LM, Lazar AJ, Cherniack AD, et al. An Integrated TCGA Pan-Cancer Clinical Data Resource to Drive High-Quality Survival Outcome Analytics. *Cell*. 2018;173(2):400-416.e11.
93. Zou Y, Jing L. Identification of key modules and prognostic markers in adrenocortical carcinoma by weighted gene co-expression network analysis. *Oncol Lett*. 2019;18(4):3673–81.
94. De Almeida BP, Apolónio JD, Binnie A, Castelo-Branco P. Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–12.
95. Schwarzenbach H, Machado Da Silva A, Calin G, Pantel K. Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Clin Chem*. 2015;61(11):1333–42.
96. Caiazza C, Poltronieri P, Mallardo M. The roles of miR-25 and its targeted genes in human cancer. In: *Recent Trends in Cancer Biology: Spotlight on Signaling Cascades and MicroRNAs: Cell Signaling Pathways and MicroRNAs in Cancer Biology*. 2018. p. 129–39.
97. Sethi N, Wright A, Wood H, Rabbitts P. MicroRNAs and head and neck cancer: Reviewing the first decade of research. *Eur J Cancer* [Internet]. 2014;50(15):2619–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.07.012>
98. Li Y, Wang F, Xu J, Ye F, Shen Y, Zhou J, et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol*. 2011;224(4):484–95.
99. Wang X, Wang H-K, Li Y, Hafner M, Banerjee NS, Tang S, et al. microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014;111(11):4262–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591631>
100. Jia W, Wu Y, Zhang Q, Gao GE, Zhang C, Xiang Y. Expression profile of circulating microRNAs as a promising fingerprint for cervical cancer diagnosis and

- monitoring. *Mol Clin Oncol* [Internet]. 2015;3(4):851–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4486870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
101. Gao J, Liu QG. The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review). *Oncol Lett*. 2011;2(6):1019–23.
  102. Wang JY, Zhang Q, Wang DD, Yan W, Sha HH, Zhao JH, et al. MiR-29a: A potential therapeutic target and promising biomarker in tumors. *Biosci Rep*. 2018;38(1):1–13.
  103. Wang X, Tang S, Le SY, Lu R, Rader JS, Meyers C, et al. Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PLoS One*. 2008;3(7).
  104. Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, et al. Robust MicroRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem*. 2010;56(6):998–1006.
  105. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif*. 2016;49(3):281–303.
  106. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, Irlam JJ, Eustace A, Hoskin PJ, et al. Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. *Br J Cancer* [Internet]. 2012;107(4):684–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805332> <http://www.nature.com/bjc/journal/v107/n4/pdf/bjc2012294a.pdf>
  107. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. 2018;27–37.
  108. Tetreault MP, Yang Y, Katz JP. Krüppel-like factors in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013;13(10):701–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3582>
  109. Yang W-T, Zheng P-S. Krüppel-like factor 4 functions as a tumor suppressor in

- cervical carcinoma. *Cancer* [Internet]. 2012;118(15):3691–702. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.26698>
110. Patel S, Xi ZF, Seo EY, McGaughey D, Segre JA. Klf4 and corticosteroids activate an overlapping set of transcriptional targets to accelerate in utero epidermal barrier acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(49):18668–73.
  111. Jaubert J, Cheng J, Segre JA. Ectopic expression of Kruppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier. *Development*. 2003;130(12):2767–77.
  112. Kuhn AR, Schlauch K, Lao R, Halayko AJ, Gerthoffer WT, Singer CA. MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells: Role of miR-25 in regulation of airway smooth muscle phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;42(4):506–13.
  113. Ding X, Zhong T, Jiang L, Huang J, Xia Y, Hu R. MiR-25 enhances cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer cells via ERK signaling pathway by inhibiting KLF4. *Mol Med Rep*. 2018;17(5):7005–16.
  114. Wu T, Hu H, Zhang T, Jiang L, Li X, Liu S, et al. MiR-25 promotes cell proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer by targeting the LATS2/YAP signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
  115. Feng S, Pan W, Jin Y, Zheng J. MiR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LATS2. *Tumor Biol*. 2014;35(12):12339–44.
  116. Zhao H, Wang Y, Yang L, Jiang R, Li W. MiR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RECK. *Mol Cell Biochem*. 2014;385(1–2):207–13.
  117. Chen X, Whitney EM, Gao SY, Yang VW. Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation. *J Mol Biol*. 2003;326(3):665–77.
  118. Li J, Zheng H, Yu F, Yu T, Liu C, Huang S, et al. Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2012;33(6):1239–46.

119. Tiwari N, Meyer-schaller N, Arnold P, Antoniadis H, Pachkov M, Van E, et al. Klf4 Is a Transcriptional Regulator of Genes Critical for EMT, Including Jnk1 (Mapk8). PLoS One. 2013;8(2).
120. Yori JL, Seachrist DD, Johnson E, Lozada KL, Schiemann WP, Keri RA. Krüppel-like Factor 4 Inhibits Tumorigenic Progression and Metastasis in a Mouse Model of Breast Cancer 1 , 2. 2011;13(7):601–10.



## EKLER

### EK 1: Etik kurul onayı

### EK 2: Sitoloji ve FFPE örneklerine ait RNA izolasyonu sonuçları

Toplanan sitoloji ve FFPE örneklerinden elde edilen RNA'lara ait miktar ölçüm sonuçları aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.3. Sitoloji ve FFPE örneklerine ait RNA izolasyon sonuçları

| Örnek Adı     | Sitoloji örnekleri, RNA miktarı (ng) | FFPE örnekleri, RNA miktarı (ng) |
|---------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Benign</b> |                                      |                                  |
| N1            | 264,8                                | 118.37                           |
| N2            | 74,48                                | 308.75                           |
| N3            | 200,62                               | 332.28                           |
| N4            | 111,69                               | 238.07                           |
| N5            | 33,36                                | 325                              |
| N6            | 253,11                               | 263.09                           |
| N7            | 40,30                                | 65.11                            |
| N8            | 286,06                               | 192.62                           |
| N9            | 259,58                               | 290.32                           |
| N10           | 165,90                               | 331.46                           |
| N11           | 66,55                                | 238.74                           |
| N12           | 62,04                                | 338.67                           |
| N13           | 262,79                               | 230.96                           |
| N14           | 262,69                               | 192.07                           |
| N15           | 110,01                               | 244.18                           |
| N16           | 520,42                               | 227.52                           |
| N17           | 474,90                               | 168                              |
| N18           | 201,08                               | 188.36                           |
| N19           | 214,77                               | 49.89                            |
| N20           | 115,67                               | 186.92                           |
| N21           | 125,07                               | 214.68                           |
| N22           | 90,41                                | 102.48                           |
| N23           |                                      | 275.27                           |
| <b>LSIL</b>   |                                      |                                  |
| L1            | 42,50                                | 113.43                           |
| L2            | 100,63                               | 174.53                           |
| L3            | 464,97                               | 154.73                           |
| L4            | 124,30                               | 168.96                           |
| L5            | 172,92                               | 107.75                           |
| L6            | 67,38                                | 250.35                           |
| L7            | 83,55                                | 111.41                           |
| L8            | 61,65                                | 172.09                           |

|             |        |        |
|-------------|--------|--------|
| L9          | 58,34  | 162.34 |
| L10         | 173,24 | 169.74 |
| L11         | 99,52  | 201.69 |
| L12         | 93,71  | 179.31 |
| L13         | 407,29 | 255.50 |
| L14         | 54,82  | 245.41 |
| L15         | 64,92  | 329-16 |
| L16         | 80,49  | 179.51 |
| L17         | 182,99 | 147.44 |
| L18         | 245,60 | 246.27 |
| L19         | 34,66  | 179.11 |
| L20         | 221,42 | 204.81 |
| L21         | 204,60 | 75.63  |
| L22         | 70,48  | 226.6  |
| L23         | 210,61 |        |
| <b>HSIL</b> |        |        |
| H1          | 207,90 | 209.8  |
| H2          | 98,71  | 194.84 |
| H3          | 116,89 | 187.87 |
| H4          | 175,31 | 204.19 |
| H5          | 145,90 | 235.63 |
| H6          | 231,34 | 216.97 |
| H7          | 498,25 | 283.48 |
| H8          | 59,71  | 216.11 |
| H9          | 44,93  | 185.17 |
| H10         | 83,87  | 281    |
| H11         | 256,20 | 324.51 |
| H12         | 100,34 | 276.55 |
| H13         | 102,5  | 151.49 |
| H14         | 58,59  | 244.78 |
| H15         | 151,50 | 184.27 |
| H16         | 119,99 | 241.21 |
| H17         | 29,98  | 138.03 |
| H18         | 192,54 | 219.09 |
| H19         | 142,88 | 153.24 |
| H20         | 149,12 | 258.98 |
| H21         |        | 173.12 |
| H22         |        | 163.28 |
| <b>SCC</b>  |        |        |
| S1          | -      | 99.54  |
| S2          | -      | 123.23 |
| S3          | -      | 105.46 |
| S4          | -      | 126.21 |
| S5          | -      | 174.24 |
| S6          | -      | 156.80 |
| S7          | -      | 108.88 |
| S8          | -      | 327.63 |
| S9          | -      | 124.80 |

|     |   |         |
|-----|---|---------|
| S10 | - | 236.99  |
| S11 | - | 318.47  |
| S12 | - | 101.78  |
| S13 | - | 224.59  |
| S14 | - | 287.85  |
| S15 | - | 86.83   |
| S16 | - | 105.91  |
| S17 | - | 222.43  |
| S18 | - | 260.26  |
| S19 | - | 317.43  |
| S20 | - | 200.56  |
| S21 | - | 1960.09 |
| S22 | - | 224.4   |



## ÖZGEÇMİŞ

### 1.Kişisel Bilgiler:

**Ad Soyad:** Ayşegül Yücel Polat

### 2. Eğitim:

2015 - : Ankara Üniversitesi, Bioteknoloji Enstitüsü (Doktora Öğrencisi)

2012-2014: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji (Yüksek Lisans)

2006-2011: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Lisans)

2002-2006: Ankara Anadolu Lisesi (Lise)

### 3. İş Denevimi

2013 - : Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

### Yayınlar

**Yucel Polat A.**, Ayva E.Ş., Ozdemir B.H., Gurdal H., Gur Dedeoglu B., MiR-25 and KLF4 relationship has early prognostic significance in the development of cervical cancer, Pathology Research and Practice, 2021.

**Yucel Polat A.**, Tepeoglu M., Ayva E.Ş., Tunca M.Z., Ozen O., Atypical glandular cells in Papanicolaou test: Which is more important in the detection of malignancy, architectural or nuclear features?, Cytopathology, 2021, doi: 10.1111/cyt.12957.

Demirezen Ş., **Yücel A.**, Beksaç M.S. Candida and Toll-like Receptors, Gynecol Obstet Reprod Med 2012; 18(3):58-60.

### Uluslararası kongrelerde sunulan bildiriler:

Senem Noyan, Fatma Funda Demirsoy, **Ayşegül Yücel Polat**, Bala Gür Dedeoğlu , “Overexpression of miR-770-5p regulates acquired trastuzumab resistance”, 31st

International Association for Breast Cancer Research Conference (IABCR 2019), Egmond, Hollanda, 15-18 Nisan 2019, Poster Sunumu.

B.H. Ozdemir, E. Akcay, A. O. Atılgan, P. Borcek, M. Tepeoglu, **A. Yücel Polat**, M. Deniz, M. Haberal, “Divergent Role of Programmed Death-Ligand (PD-L1) in Renal Allografts with Antibody-Mediated Rejection (AMR)”, 27<sup>th</sup> International Congress of The Transplantation, Madrid, İspanya 30 Haziran -5 Temmuz 2018, Sözlü sunum.

**A. Yücel Polat**, M. Tepeoglu, “Non-Gynaecological malignancies in Pap smear”, 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Amsterdam, Hollanda, 2-6 Eylül 2017, E-Poster.

**A. Yücel Polat**, M. Tepeoglu, “Primitive neuroectodermal tumour of uterus in Pap Smear: A case report”, 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Amsterdam, Hollanda, 2-6 Eylül 2017, Poster Sunumu.

**A. Yücel Polat**, M. Tepeoglu, M. Z. Tunca, E. S. Ayva, O. Ozen. “Atypical glandular cells in Pap smears: A retrospective study with histopathological correlation”, 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Amsterdam, Hollanda, 2-6 Eylül 2017, Poster sunumu.

**A. Yücel Polat**, Y. Oztemur Islakoglu, A. Aydos, S. Noyan, B. Gur Dedeoglu,” Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples”, 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Amsterdam, Hollanda, 2-6 Eylül 2017, Poster sunumu.

**A. Yücel Polat**, G. Ozgun, B.H. Ozdemir, “The Importance of iNOS expression in Pap Smears”, 39<sup>th</sup> ECC European Congress of Cytology, Milano, İtalya, 20-23 November 2015, Sözlü sunum

#### **Ulusal kongrelerde sunulan bildiriler:**

**A. Yücel Polat**, M. Tepeoğlu, M. Z. Tunca, E. Ş. Ayva, Ö. Özen, A. Ayhan, “Pap Smear’deki Atipik Glandular Hücrelerin Sitomorfolojik Olarak Değerlendirilmesi ve Doku Tanısı ile Karşılaştırılması”, 28. Ulusal Patoloji Kongresi, Ankara, 27-30 Ekim 2018, Sözlü Sunum

## TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

**Yücel Polat A.**, Ayva E.Ş., Ozdemir B.H., Gurdal H., Gur Dedeoglu B., MiR-25 and KLF4 relationship has early prognostic significance in the development of cervical cancer, Pathology Research and Practice, 2021.

## TEZDEN ÇIKAN BİLDİRİLER

**A. Yücel Polat**, Y. Oztemur Islakoglu, A. Aydos, S. Noyan, B. Gur Dedeoglu,” Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples”, 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology, Amsterdam, Hollanda, 2-6 Eylül 2017, Poster Sunumu





## MiR-25 and KLF4 relationship has early prognostic significance in the development of cervical cancer

Aysegul Yucel Polat<sup>a</sup>, Ebru Sebnem Ayva<sup>b</sup>, Hakan Gurdal<sup>c</sup>, Binnaz Handan Ozdemir<sup>b</sup>, Bala Gur Dedeoglu<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

<sup>b</sup> Bakant University, Medical School, Department of Pathology, Ankara, Turkey

<sup>c</sup> Ankara University, Faculty of Medicine, Department of Medical Pharmacology, Ankara, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Cervical cancer  
Meta-analysis  
miRNA  
mRNA  
Cervical cytology  
FFPE tissues

### ABSTRACT

Cervical squamous cell carcinoma (SCC) is one of the common cancer types among women. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that play an important role in the formation and development of many cancer types by regulating expression of their targets. While many studies have investigated the relationship between miRNAs and cervical cancer, no robust miRNA biomarkers have been defined yet for diagnosis of cervical lesions.

In this study, we performed a statistical meta-analysis to identify miRNAs and a class comparison analysis to evaluate miRNAs with the power to discriminate between normal, intraepithelial lesions and invasive cancer samples. Differentially expressed (DE) miRNAs were compared with the targets of meta-miRNAs. After bioinformatics analysis and qRT-PCR validations with cytology samples and FFPE tissues, we defined miR-25 and its target KLF4 (Kruppel-like factor 4) as candidate biomarkers for *in vitro* studies. Our results showed that miR-25 expression was significantly higher in precancerous lesions and invasive carcinoma while presenting consistent expression patterns in both cytological and FFPE tissue samples. In line with this, its direct target KLF4 expression decreased in precancerous lesions in cytological samples and also in the invasive cancer group in FFPE tissues. Furthermore, *in vitro* studies showed that miR-25 inhibition decreased proliferation and motility of HeLa cells and promoted an increase in the protein level of KLF4. We conclude that inhibition of miR-25 may upregulate KLF4 expression and regulate cell proliferation and motility in cervical cancer.

### 1. Introduction

Cervical cancer is reported as the fourth most common and deadly cancer among women [1]. Human Papilloma Virus (HPV) plays a vital role in the progress of cervical squamous cell carcinoma (SCC) as it causes the formation of precursor lesions of invasive cancer. These lesions are graded into two groups: low-grade intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade intraepithelial lesions (HSIL). LSILs are the first step in HPV infection and generally regress spontaneously over years. In contrast, a small subgroup progress to HSILs and become permanent while progressing to invasive cancer [2,3].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of 19–20

nucleotides in length. They regulate expression of their targets by inducing mRNA degradation or translational inhibition. MiRNAs are involved in cancer development as tumor suppressors or oncogenes through their key roles in cell proliferation, differentiation and apoptosis. Their involvement in the progression of various cancer types has been well studied [4–6]. miRNAs are also potential powerful biomarkers for detecting precursor lesions or invasive cancers due to their high stability for biological analysis of blood or other body fluids and tissues [7,8]. While several studies have investigated the functions of miRNAs, their precise role in the development of cervical cancer remains unclear.

Given that cervical cancer is life threatening, it is important to detect

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; FFPE, formalin fixed paraffin embedded tissues; GEO, gene expression omnibus; HPV, human papilloma virus; HSIL, high grade intraepithelial lesion; KLF4, Kruppel-like factor 4; LSIL, low grade intraepithelial lesion; mRNA, messenger RNA; miRNA, MicroRNA; SCC, squamous cell carcinoma; TCGA, the cancer genome atlas.

\* Corresponding author at: Ankara University Biotechnology Institute, Keçiören, Ankara, 06135, Turkey.

E-mail addresses: [aysegul-yucel@hotmail.com](mailto:aysegul-yucel@hotmail.com) (A. Yucel Polat), [ekupana@yahoo.com](mailto:ekupana@yahoo.com) (E.S. Ayva), [hkgndrl@gmail.com](mailto:hkgndrl@gmail.com) (H. Gurdal), [handan27@hotmail.com](mailto:handan27@hotmail.com) (B.H. Ozdemir), [gurbala@yahoo.com](mailto:gurbala@yahoo.com) (B. Gur Dedeoglu).

<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153435>

Received 20 January 2021; Received in revised form 25 March 2021; Accepted 4 April 2021

Available online 9 April 2021

0344-0338/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

its precursor lesions with high sensitivity and specificity before it becomes more invasive. This requires the identification of new specific molecular biomarkers and investigation of their functions in the formation and progression of cervical cancer. Accordingly, in this study, we aimed to identify specific miRNA and mRNA signatures that play key roles in the development and progression of the disease. We designed a three-step study. First, we used bioinformatics analysis to identify differentially expressed (DE) miRNAs and their mRNA targets in normal, precancerous lesions and tumor samples. Second, we investigated the expression levels of selected miRNAs and their targets in independent cytological and FFPE tissue samples of cervix diagnosed as normal, LSIL, HSIL and SCC. Third, we evaluated the effects of the candidate miRNA and its target mRNA on proliferation and cell motility in HeLa cells.

## 2. Materials and methods

We designed a three-step process to identify new potential biomarkers for the detection of precursor lesions of cervical cancers and explore their functions *via in vitro* experiments. For this, first we identified bioinformatically miRNAs and their targets in different pathological grades of cervical lesions. We then measured their expression levels in independent samples. Finally, we determined their functions in proliferation and cell motility in HeLa cells. Fig. 1. shows the general workflow of the study.

### 2.1. Literature search and selection of miRNA and mRNA datasets

The GEO (Gene Expression Omnibus) and Array Express databases were used to obtain miRNA and mRNA datasets for bioinformatics analysis [9,10]. These datasets were searched using the key words "miRNA", "mRNA", "microarray", "cervical cancer", and "cervical intraepithelial neoplasia" together. We selected three microarray studies for miRNA analysis (GSE51993 [11], GSE30656 [12] and GSE19611 [13]) and two microarray studies for mRNA analysis (GSE63514 [14], GSE27678 [15]). These included at least three of the normal, LSIL, HSIL and

SCC groups. Raw miRNA and mRNA expression data were then downloaded (Table 1) before applying quantile normalization to all samples with BRB-Array Tools. Each dataset was then restructured according to its pathological information for standardization to be used in the meta-analysis and class comparison analysis.

### 2.2. Meta-analysis with miRNA datasets

Three miRNA studies were combined using the ANOVA-dependent ranking-based meta-analysis program, previously developed in our laboratory [16]. We used this program to identify DE miRNAs that could discriminate between normal, LSIL, HSIL and SCC samples. In the first step of the meta-analysis, the samples were grouped according to their pathological status and ANOVA test were used to detect the p-values of

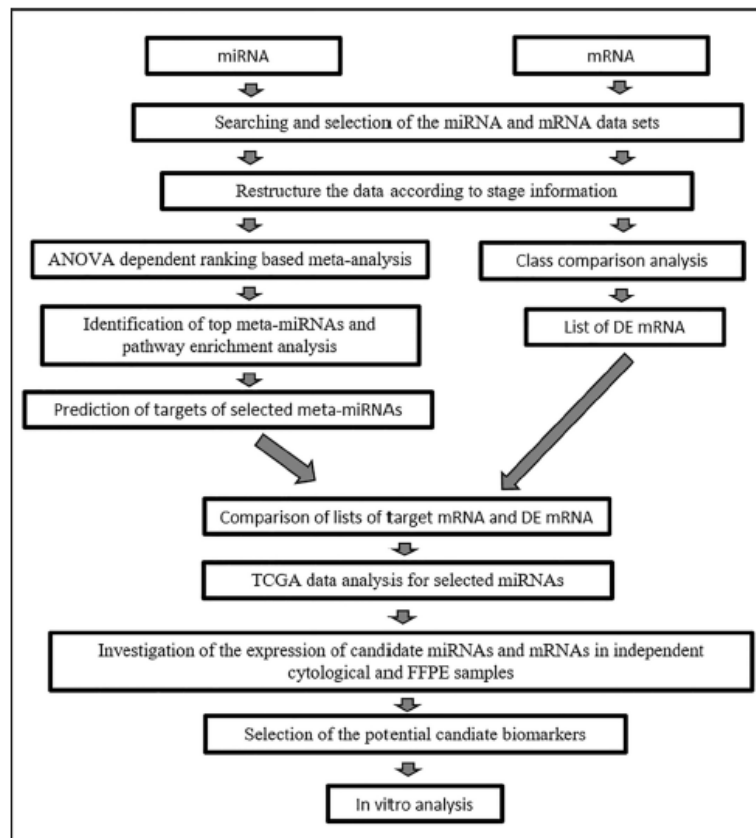


Fig. 1. General flow chart of the study.

**Table 1**  
Details of the miRNA and mRNA datasets used for meta-analysis and class comparison analysis.

| miRNA studies | Platform                                                                 | Normal | LSIL | HSIL | SCC |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------|--------|------|------|-----|
| GSE51993      | Illumina Human v2 MicroRNA expression beadchip                           | 7      | 9    | 8    |     |
| GSE30656      | Agilent-016436 Human miRNA Microarray 1.0                                | 10     |      | 18   | 10  |
| GSE19611      | National DNA microarray facility of University of Aveiro miRNA chip v1.1 | 23     | 9    | 7    | 4   |
| Total         |                                                                          | 40     | 10   | 33   | 14  |
| mRNA studies  | Platform                                                                 | Normal | LSIL | HSIL | SCC |
| GSE63514      | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array                              | 24     | 14   | 40   | 23  |
| GSE27678      | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array                              | 14     | 11   | 21   | 23  |
| Total         |                                                                          | 38     | 25   | 61   | 56  |

miRNAs between groups. The miRNAs in the lists were then ranked according to their p-values for each study. In the second step, the mean of each miRNA's rank in all studies was calculated to represent its real rank in the meta-list, which was used instead of the significance value.

### 2.3. Pathway enrichment analysis for meta-miRNAs

The DIANA-mirPath tool was used to determine the signaling pathways that the mRNA targets of meta-miRNAs were commonly involved in and for hierarchical clustering analysis to identify relationship between these miRNAs [17]. Finally, the miRNAs that clustered in common pathways were selected for further analysis.

### 2.4. Prediction of selected meta-miRNA targets

The targets of selected meta-miRNAs were identified bioinformatically using the miRDB [18] (<http://www.mirdb.org/>) and miRWalk [19] (<http://zmf.unim.uni-heidelberg.de/apps/zmf/miRwalk2/>) databases, which contain extensive predicted and validated miRNA targets. The predicted targets from miRDB and validated targets from miRWalk were then used to create the list of target genes before the lists were intersected to detect common targets.

### 2.5. mRNA dataset analysis and evaluation of DE genes

After normalization, the two mRNA datasets were used to identify DE genes in normal, precancerous lesions and SCC groups. Class comparison analysis (two-sample t-test) was performed with a minimum two-fold change ( $p \leq 0.05$ ) for each normal, precancerous and invasive group. The lists of DE genes obtained from these separate analyses were then combined and intersected with the list of target genes of selected meta-miRNAs using Venny [20] (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

### 2.6. TCGA data analysis

The cervical cancer data (CESC) obtained from the Cancer Genome Atlas (TCGA) were downloaded to evaluate the clinical significance of the selected meta-miRNAs using Xena Browser [21]. Three normal and 306 tumor samples were compared with Mann Whitney U tests to identify significant alterations in meta-miRNA expression levels in the TCGA dataset.

### 2.7. Sample collection and processing for qRT-PCR validation

The potential candidate miRNAs were validated with liquid-based cervical cytology samples collected in ThinPrep solution (Hologic, USA) and formalin-fixed paraffin-embedded tissues (FFPE) obtained from the Pathology Department of Baskent University, Turkey. The cytological samples were included after routine pathological examination and subcategorized according to the Bethesda classification. The ThinPrep tubes were stored at +4 °C until processing. The sample population included 22 women with normal cytology, 23 with LSIL and 19 with HSIL.

Since Pap smear testing is commonly used for detecting precursor lesions, the invasive tumor cases could not be included in cytological samples. MiRNA experiments were performed with all samples, however, due to the RNA quality in cytological samples only 11 samples with normal, 9 samples with LSIL and 5 samples with HSIL among the same samples could be used for mRNA experiments. For the tissue analysis, archival FFPE tissue samples were selected according to their lesion types and tumor area size. After microscopic screening of each sample, the lesion area was marked on a paraffin block and removed by a special needle for punch biopsy to avoid peripheral tissue contaminations. The FFPE tissues included 22 normal, 20 LSIL, 22 HSIL and 18 SCC samples for the miRNA experiments. Because of the low RNA quality in the FFPE tissues, these samples could not be used in the mRNA qRT-PCR experiments.

### 2.8. Validation of meta-miRNAs and mRNAs by qRT-PCR

#### 2.8.1. RNA isolation

The total RNA from the cytological samples was extracted using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) while the total RNA from the FFPE samples was isolated using miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Germany) following manufacturer's instructions. RNA quality and quantity were checked with NanoDrop 1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA).

#### 2.8.2. cDNA synthesis

Mature miRNA cDNA was generated by using miScript II RT kit (Qiagen, Germany). The total 20 µl reverse transcription mix contained 15 ng/µl RNA, 4 µl 5x miScript HiSpec Buffer, 2 µl 10x miScript Nucleic Mix, 2 µl miScript Reverse Transcriptase mix and RNase free water. To synthesize the cDNA library, the mix was first incubated for 60 min at 37 °C and then the reaction was inactivated for 5 min at 95 °C.

The mRNA cDNA was synthesized by using Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cDNAs were stored at -20 °C for further analysis.

#### 2.8.3. qRT-PCR

To quantify the expression levels of the miR-25, let-7i, miR-26a, miR29a and let-7d, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using specific primers (miScript Primer Assays; Qiagen) and miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Germany) on the Roche Light Cycler 480 System. The PCR conditions were as follows: denaturation at 94 °C for 15 s., annealing at 55 °C for 30 s. and extension at 70 °C for 30 s. Specific primers for KLF4 were designed and qRT-PCR was performed with Fast Start SYBR Green (Roche) PCR kit. The primer list is given in Supplementary Table 1.

The qRT-PCR results were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [22]. The geometric means of miR23a-3p and miR191-5p Ct values were used as normalization factor to normalize the relative expression of miRNAs while GAPDH Ct values were used for mRNA normalization [23].

### 2.9. Immunohistochemistry

To measure KLF4 protein levels in the FFPE tissues, IHC staining was performed with 17 normal, 13 LSIL, 12 HSIL and 18 SCC samples. The

same samples were also used to determine miR-25 expression in the qRT-PCR experiments. Five  $\mu\text{m}$  tissue sections were deparaffinized before staining and all slides were stained with the Dako OMNIS (Agilent Technologies) automated staining platform. The default IHC protocol was used according to the manufacturer's instructions. In the antigen retrieval step, EDTA buffer (EnVFlex HRS, High pH) was used before the slides were incubated for 30 min. with KLF4 rabbit antibody (1:200, St John's). Nuclear staining was considered as positive staining while the percentage of immunopositive cells per tissue section was determined by two independent pathologists in a blinded manner.

#### 2.10. Cell culture and transfection

The human cervical cancer cell line, HeLa (ATCC® CCL2™) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DM30022.01, HyClone), supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % penicillin/streptomycin. It was maintained at 37 °C in a humidified incubator with 5 % CO<sub>2</sub>.

The HeLa cells were seeded into 6-well plates ( $2 \times 10^5$  cells/well) and incubated overnight before transfection. Transfection was performed with Dharmafect-1 Transfection reagent (Dharmacon, T-2001-03), miR-25 inhibitor (Dharmacon, IH-300498-07-0005) and miRNA negative control (Dharmacon, IN-001005-01-05) according to the manufacturer's instructions.

#### 2.11. Cell proliferation and woundhealing assay

Proliferation and wound healing assay (WHA) were performed to determine the effect of miR-25 inhibition on cell proliferation and motility. For the WHA, after transfection, a wound was generated with a 20  $\mu\text{L}$  tip and the proliferation and motility of cells were observed for 66 and 24 h respectively with real-time cell monitoring using the IncuCyte S3 Live-Analysis system. Proliferation was analyzed with IncuCyte Cell-By-Cell Analysis software (ESSEN BIOSCIENCE, MI, USA). The scraped areas in the images taken at 0 h, 12 h and 24 h were measured using Image J (NIH, USA) software.

#### 2.12. Western blot analysis

The HeLa cells were harvested and lysed with Complete Lysis-M kit (Roche) after 72 h of transfection. Quantification of the cell lysate protein concentrations was carried out using Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Thermo Scientific). 15  $\mu\text{g}$  of proteins were loaded from each sample on 12 % SDS-PAGE gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (L-08008-001, Advanta). After blocking with 5 % milk powder in TBS-T, the membranes were incubated for 1 h with beta-actin antibody (1:1000, Biolegend) at room temperature and overnight at +4 °C with KLF4 antibody (1:1000, St John's) and SNAIL antibody (1:1000, Cell Signaling) in 3 % milk powder in TBS-T. Following incubation, horseradish peroxidase-conjugated Anti-rabbit IgG (1:10000, Cell signaling) or Anti-mouse IgG (1:5000, Biolegend) antibodies were applied to the membrane as secondary antibodies. The specific protein bands were visualized with Li-Cor Odyssey CLx (Li-Cor Inc.) using WesternBright Sirius Kit (K-12043-D20, Advanta). Quantitative analysis of the signal intensity was performed using a professional image analysis software, Image J (NIH, USA).

#### 2.13. Statistical analysis

To compare the differences in miRNA expression levels between the normal, precancerous lesion and invasive cancer groups in both the cytological and FFPE samples, all groups were analyzed with either one-way ANOVA or Kruskal Wallis tests with an appropriate post hoc test depending on the results of normality and homogeneity of variances tests. For two group analyses, Mann Whitney U or t-tests were performed. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ . For

assessing normality of samples, histogram graphs, detrended normal Q-Q plots, the coefficient of variation (positive if it is  $< 0.30$ ), skewness and kurtosis values and test of normality (Shapiro-Wilk test) were examined and if three out of five tests were positive, sample distribution was considered as normal.

### 3. Results

#### 3.1. Bioinformatic analyses highlighted DE miRNAs and their targets between normal and lesions of cervical samples

We used three independent miRNA microarray studies for the meta-analysis and two mRNA microarray studies for the class comparison analysis. In total, we obtained 40 normal, 18 LSIL, 33 HSIL and 14 SCC samples from the miRNA studies and 38 normal, 25 LSIL, 61 HSIL and 56 SCC samples from the mRNA studies (Table 1). ANOVA dependent-ranking-based meta-analysis was performed to find out DE miRNAs (meta-miRNAs) between all lesion types and normal samples in all datasets. This meta-analysis identified 70 meta-miRNAs (Supplementary Table 2). Based on their real rank scores, the top 10 meta-miRNAs were selected for further analysis (Table 2).

For further characterization of the functions of these top 10 meta-miRNAs, DIANA Tools-mirPath was used. The pathway enrichment analysis showed that their targets played important roles in cancer-related pathways, such as cell cycle, p53 signaling pathway, adherens junction and viral carcinogenesis. In addition, the two-sided hierarchical clustering analysis revealed the relationships between these meta-miRNAs based on the pathways they were involved in. Specifically, miR-25, let-7i, miR-26a and let-7d were clustered significantly among the other miRNAs (Fig. 2A). This significant clustering led us to focus on these four miRNAs because of their involvement in the same pathways.

In the next step, we used two independent databases (miRDB and miRWalk) to identify the targets of the four selected meta-miRNAs. Intersecting the common targets of the four miRNAs revealed that 345 genes were common targets. A class comparison analysis was performed with two independent datasets (GSE63514 and GSE27678), which showed that 391 genes between normal and LSIL, 1,044 genes between normal and HSIL, and 1,988 genes between normal and SCC were differentially expressed. We then used Venny to determine if the meta-miRNA targets have common elements with DE mRNAs. This showed that three genes, CA2, CDC6 and KLF4 are common for both the target genes and DE mRNAs (Fig. 2B). Thus, the miRNA target and DE mRNA analyses indicated that these three genes and miR-25, let-7i, miR-26a and let-7d should be used for further analysis.

#### 3.2. TCGA data analysis provided clinical significance of meta-miRNAs

We wanted to evaluate the clinical significance of the candidate meta-miRNAs. To do so, we used the TCGA data set, CESC, to explore the expression profiles of the selected meta-miRNAs in normal and cervical tumor tissues. Compared to normal tissue samples, let-7i, miR-25 and let-7d expression were upregulated in tumor samples whereas miR-26a

Table 2  
List of top-ten meta-miRNAs.

| Real rank | miRNA         | The mean of rank |
|-----------|---------------|------------------|
| 1         | has-miR-200a* | 33.5             |
| 2         | has-let-7i    | 36.5             |
| 3         | has-miR-145   | 46               |
| 4         | has-miR-150   | 53               |
| 5         | has-miR-29a   | 50.5             |
| 6         | has-miR-204   | 59               |
| 7         | has-miR-25    | 59.5             |
| 8         | has-miR-143   | 60.5             |
| 9         | has-miR-26a   | 60               |
| 10        | has-let-7d    | 70               |

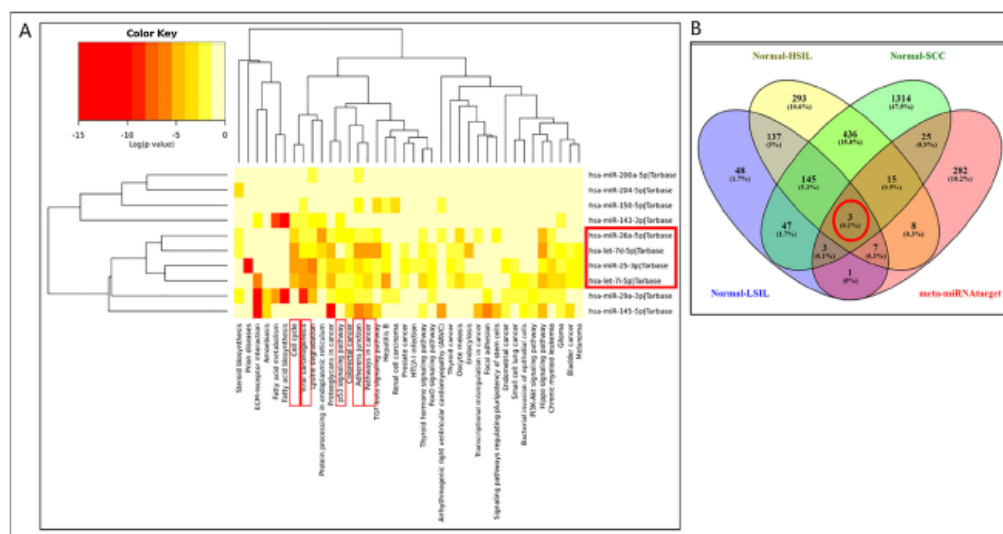


Fig. 2. (A). Heatmap for pathway enrichment analysis results showing the pathways that the top-ten meta-miRNAs are commonly involved in (shown as columns) and the most closely related miRNA clusters according to the hierarchical clustering analysis (shown as rows) (B). Intersection of the selected meta-miRNA targets and DE mRNAs obtained from the class comparison analysis.

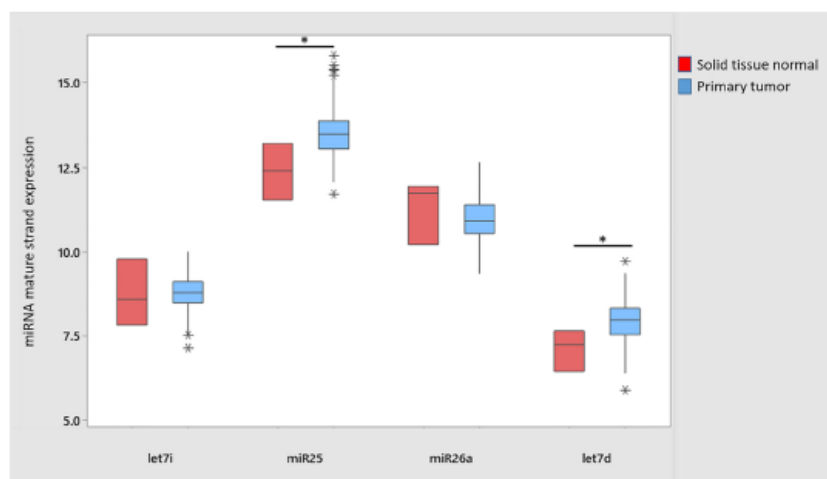
expression was downregulated (Fig. 3). However, these differences were only statistically significant for miR-25 and let-7d.

### 3.3. miR-25 expression significantly differentiated between both cytology samples and FFPE tissues

To identify the expression profiles of the selected meta-miRNAs, qRT-PCR experiments were performed on independent cervical cytology and FFPE samples. All samples were grouped according to their cytological and histological diagnosis, which defined the grade information of the samples. Normal samples were used as the control group

for both sample types.

The results showed that miR-25 was the most prominent candidate to discriminate between normal samples, precancerous lesions and tumor samples because its expression level increased consistently from normal to precancerous lesions in the cytological samples and from normal to tumor FFPE samples. Hence, it is also worth to mention that consistent expression patterns were observed in cytology and FFPE samples. While there were no significant differences in miR-25 expression between LSIL and HSIL for either sample type, there were statistically significant differences after combining the two precancerous lesion types as a single transition stage between the normal and SCC groups. Specifically, miR-



**Fig. 3.** TCGA data analysis results for the selected meta-miRNAs using the CESC data set. miR-25 and let-7d expression were upregulated significantly in tumor samples compared to normal samples (Mann-Whitney U; \* $p < 0.05$ ).

25 expression in the transition stage group differed significantly from the normal group for the cytology samples and from the SCC group for the FFPE samples (Fig. 4A and B). While there were also some significant differences in expression levels for other meta-miRNA expression between the pathological subgroups, these differences were not consistent between either the groups or sample types (Supplementary Fig. 1).

### 3.4. miR-25 and its target KLF4 showed reverse expression patterns in both the cytology and FFPE samples

Given the bioinformatics analysis results and the qRT-PCR results from the miRNA expression experiments, we decided to investigate the clinical significance of KLF4 as the target of miR-25. To measure KLF4 expression levels at different pathological stages, qRT-PCR analysis was performed with the cytological samples while IHC staining was applied to the FFPE tissue samples to examine KLF4 protein levels. This showed that, in the precancerous lesion group, miR-25 expression increased while expression of its target KLF4 significantly decreased in cytological samples (Fig. 4C). For the IHC staining, the percentage of immunopositive cells was evaluated for each sample. This showed that KLF4 expression was predominantly localized in the nucleus but cytoplasmic staining was also apparent. There was only a slight decrease in staining from the normal to precancerous lesions and no significant differences between the normal, LSIL and HSIL groups. However, there was a remarkable lack of KLF4 positivity in the tumor samples: the percentage of KLF4 staining reduced dramatically from 90 % in normal and 83 % in precancerous lesion tissues to 37 % in SCC tissues. Fig. 4D shows the IHC results from all groups while Fig. 4E, F, G and 4H present representative IHC staining images for each group. To further assess the clinical significance of KLF4 and miR-25 relationship we performed TCGA data analysis with CESC dataset and concordantly found out that KLF4 expression was lower in tumor samples compared to normal samples while miR-25 expression was significantly high in tumor samples (Supplementary Fig. 2).

### 3.5. Inhibition of miR-25 regulates cancer cell behavior in HeLa cells by regulating KLF4

To validate the miR-25 and KLF4 relationship in cervical cancer and to show their effects on cell proliferation and motility, we transfected miR-25 inhibitor into HeLa cells. Inhibition of miR-25 caused an upregulation of KLF4 protein level (Fig. 5A). Consistent with the qRT-PCR analysis and IHC staining results, miR-25 and KLF4 expression were conversely regulated in cervical cancer cells.

To investigate the role of miR-25 in cell growth, we performed a proliferation assay with HeLa cells. In comparison with the mock transfected and negative control treated group, the cell proliferation rate was reduced significantly after silencing miR-25 in HeLa cells (Fig. 5B).

Using a wound healing assay, we further examined the function of miR-25 on HeLa cell motility, which is the key step in malignant progression and metastasis. Inhibition of miR-25 activity in HeLa cells reduced cell motility compared to scr-transfected cells (Fig. 5C). We also investigated Snail expression levels, which is a well-known mesenchymal marker, regulated by KLF4, and involved in cell motility in transfected HeLa cells. Snail protein levels also decreased after miR-25 inhibition (Fig. 5A).

Taken together, these results demonstrate that miR-25 down-regulation inhibited the migration and proliferation ability of HeLa cells.

## 4. Discussion

In this study, we investigated miRNAs and their targets, which are involved in the formation and progression of cervical carcinoma. miRNAs play a key role in many biological processes, including cancer development, by regulating their targets. Their expression levels vary in different tissues and many studies report different expression levels in

normal and tumor tissues [24]. The results of our study suggest that miR-25 is a prominent biomarker for diagnosing cervical lesions while it may also induce the proliferation and motility of cervical cancer cells by targeting KLF4.

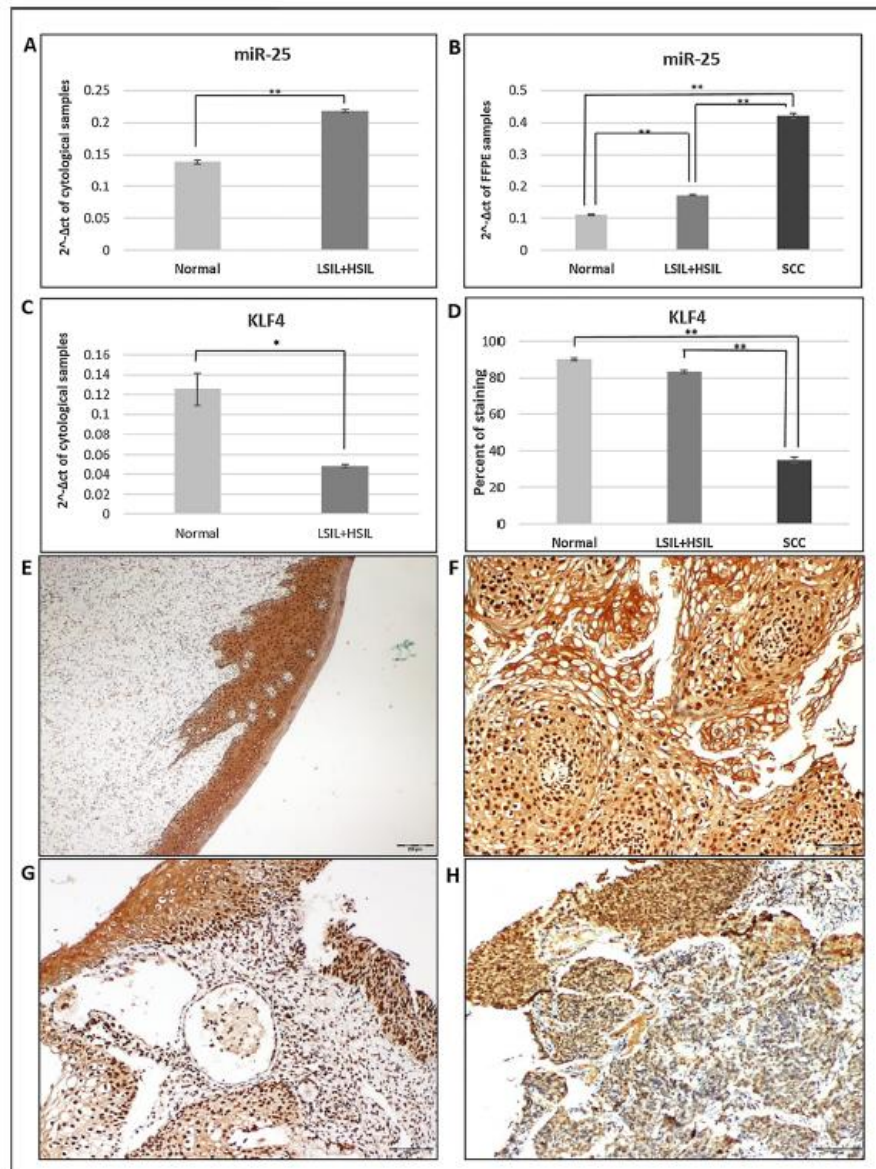
To identify candidate miRNAs that can be used to discriminate between normal, precancerous lesions and invasive cervical carcinoma, we first used an ANOVA-dependent ranking-based meta-analysis approach by combining the results of different studies from the literature [16]. This meta-analysis increased the sample size and provided generalized comparisons for DE miRNAs between normal and cervical lesion grades. From this meta-analysis, we determined the robust DE miRNAs between normal, precancerous and invasive lesions. In the next step of the bioinformatics analysis, pathway enrichment analysis was performed to define which signaling pathways the targets of meta-miRNAs are involved in. The results indicated that four meta-miRNAs (miR-25, let-7i, let-7d and miR-26a) may take part in the formation and progression of cervical cancer since their targets have roles in viral carcinogenesis, the p53 signaling pathway and the cell cycle. Kumar et al. reported that miR-25 regulates p53, which plays a key role in HPV-related carcinogenesis [25]. On the other hand, miR-25, let-7i and let-7d induce mitogenic stimulus and exit from quiescence by regulating cyclins and cyclin-dependent kinases in the cell cycle while miR-26a represses cyclins and reduces cancer cell proliferation [26]. These findings support the potential contribution of these four meta-miRNAs in the progression of cervical cancer.

The TCGA datasets contain detailed molecular and clinical data about many cancer types and they are widely used for biomarker identification, survival analysis and identifying the biomolecules that distinguish between normal and tumor samples [27–29]. We used TCGA CESC data to evaluate the clinical significance of four selected meta-miRNAs in normal and cervical tumor samples. Concordant with the meta-analysis results, miR-25 and let-7d expression was significantly higher in tumor samples than normal tissues.

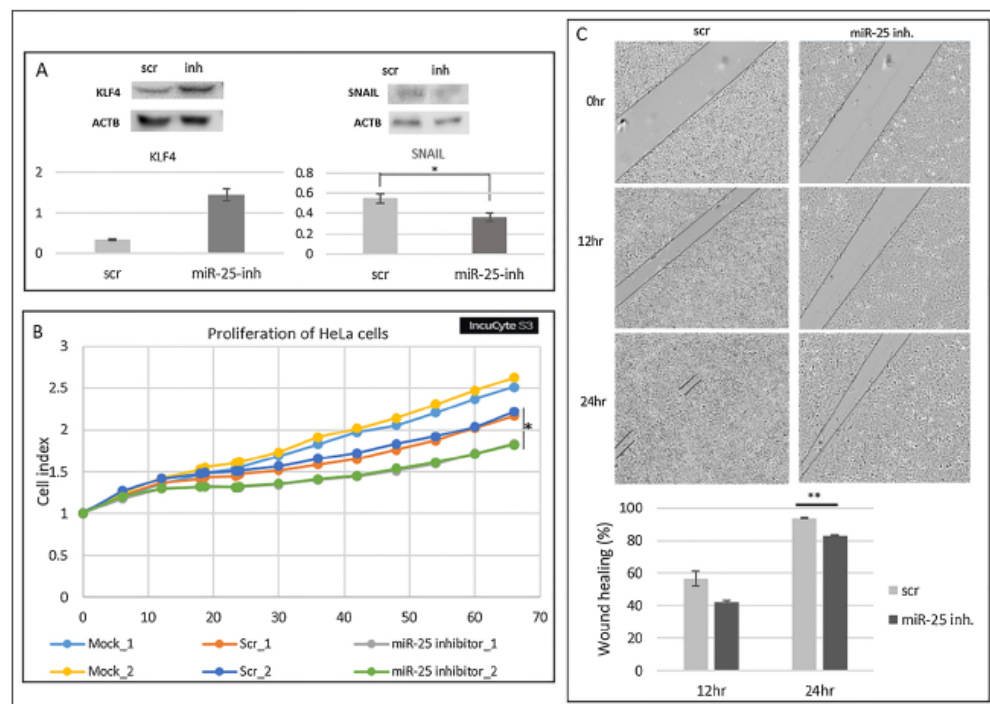
The results of the pathway enrichment analysis with the meta-miRNAs and the TCGA data analysis led us to investigate the expression profiles of these miRNAs in independent cervical samples. Using qRT-PCR analysis with independent samples, we confirmed that miR-25 is the most prominent candidate to discriminate intraepithelial lesions and invasive cancer from normal samples and from each other, both for cytology and FFPE samples. Although many studies have shown the oncogenic and tumor suppressor function of miR-25 in different cancer types, it is mainly described as an oncogenic miRNA involved in the formation and development of many tumor types [30,31]. The oncogenic effect of miR-25 overexpression has been well defined in several cancer types, including hepatocellular carcinoma, lung cancer, gastric cancer, breast cancer and ovarian cancer [31]. For example, miR-25 is upregulated in head and neck squamous cell carcinoma [32]. miR-25 levels are also elevated in intraepithelial lesions and invasive cancer but also miR-25 upregulation occurs via HPV E7 oncoprotein induction [33]. Circulating levels of miR-25 are also higher in serum samples from cervical cancer patients [34].

However, although various studies using cervical samples have reported miR-25 upregulation, its expression profile has not yet been evaluated in cytology samples. Therefore, we included cytological as well as FFPE samples to validate miR-25 expression. Concordant with the literature, we found a gradual and significant increase in miR-25 expression from normal to precursor lesions to tumor state in both cytological and FFPE samples [12]. This is thus the first study to indicate that miR-25 could be an early diagnostic biomarker for cervical cytology samples. Moreover, previous studies suggested that miRNAs are more stable biomolecules than mRNAs in various sample types, such as blood or other body fluids, and FFPE tissues [7,8,35]. In line with the literature, we found for qRT-PCR analysis that miRNAs are more stable than mRNAs in both cervical cytology and FFPE samples.

On the other hand, as a zinc-finger containing transcription factor, KLF4 plays a role in many tumor types, functioning commonly in tumor



**Fig. 4.** MiR-25 expression levels in the different cervical sample groups. MiR-25 increased significantly from normal samples to precancerous lesions in the cytological samples (A) and from normal to invasive carcinoma through precancerous lesions in the FFPE tissue samples (B). The results in A and B are shown as group and SEMs. For the cytology group,  $n = 20$  for normal samples,  $n = 42$  for LSIL + HSIL; Mann Whitney U,  $^{**}p < 0.01$ ; for the FFPE group,  $n = 22$  for normal samples,  $n = 42$  for LSIL + HSIL,  $n = 18$  for SCC; Kruskal Wallis,  $^{**}p < 0.01$ . (C). Reduced KLF4 expression in precancerous lesions compared to normal group in cytological samples ( $n = 9$  for normal samples,  $n = 14$  for LSIL + HSIL, Mann Whitney U,  $^{*}p < 0.05$ ). (D). Mean percentages of immunopositive cells stained with KLF4 antibody in normal, precancerous and invasive carcinoma groups (Kruskal Wallis,  $^{**}p < 0.01$ ). (E). Representative image of diffuse and strong nuclear and cytoplasmic positivity for KLF4 in normal cervical epithelium. (F). Representative image of LSIL cells with positive and negative nuclear staining. (G). Representative image of LSIL cells showing positive and negative nuclear staining on the left and HSIL cells showing diffuse staining on the right. (H). Representative image showing HSIL cells with diffuse positive staining and the loss of KLF4 protein expression in tumor cells.



**Fig. 5.** Effect of miR-25 downregulation in HeLa cells. (A). KLF4 and SNAIL protein levels were investigated in HeLa cells after transfection with miR-25 inhibitor (miR-25-inh) using Western blot analysis. Values represent the mean  $\pm$  SD of two biological replicates for KLF4 and three biological replicates for SNAIL (*t*-test,  $^{*}p < 0.05$ ). (B). Effect of miR-25 inhibition on the cell growth of HeLa cells. Proliferation was significantly reduced in miR-25 inhibitor-transfected HeLa cells compared with control cells (*t*-test,  $^{**}p < 0.01$ ). (C). Images showing the wounds at 0, 12 and 24 h. The comparable wounds with the same gap width ( $440 \pm 5 \mu\text{m}$ ) were selected for the comparison of scr and inhibitor transfected cells. MiR-25 inhibition significantly reduced HeLa cell motility at 24 hr. The percentage of the wound healing area was calculated for each time period and presented as bar graphs (*t*-test;  $^{**}p < 0.01$ ).

suppression including in cervical cancer [36]. *In vivo* studies show that it is highly expressed in skin epithelium and participates in the acquisition of the skin barrier [37,38]. Our integrative analysis with meta-miRNA targets and DE mRNAs to compare normal and cervical lesion stages indicated that KLF4 is a potential mRNA marker, which is the target of miR-25. In addition, we showed a converse expression pattern between the expression profiles of miR-25 and its target KLF4 in both cytology and FFPE samples. That is, while miR-25 expression increased from normal to tumor samples, KLF4 expression decreased both in mRNA and protein levels. The relationship between miR-25 and KLF-4 was previously shown in non-small cell lung cancer and airway smooth muscle cell cancers but not in cervical cancer before [39,40]. Thus, the relationship between miR-25 and its target KLF4 is shown for the first time in cervical cancer in this study. Furthermore, to determine the molecular function of miR-25 and KLF4 in cervical cancer, we performed *in vitro* experiments with the HeLa cell line.

MiR-25 induces cell proliferation and motility in many cancer types by targeting different genes [41–43]. In addition, Chen et al. reported that KLF4 is strictly related to regulation of cell-cycle related genes and induces the inhibition of cell proliferation and epithelial cell differentiation while the lack of KLF4 expression leads to skin tumorigenesis by inducing cell proliferation [44,45]. In our study, after inhibition of miR-25, KLF4 protein levels increased in HeLa cells and, therefore, cell proliferation was significantly reduced. We also found a correlation between downregulation of miR-25 and reduction in cell motility with WHA. Several studies have revealed that SNAIL expression plays an

important role in the EMT process and metastasis is negatively regulated by KLF4 [46,47]. In parallel with the literature, SNAIL expression in our study decreased in HeLa cells transfected with miR-25 inhibitor, which increased KLF4 expression. This may explain the regulative role of miR-25 in cervical cancer cell motility. Concordant with our results, Song et al. showed that miR-25 reverses epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant cervical cancer cells, which also emphasizes the role of miR-25 in motility and invasion [48]. Taken together, our findings may support the early prognostic potential of the miR-25 and KLF-4 relationship in the development of cervical cancers.

#### Ethical approval statement

The ethics committee of the Ankara University Medical Faculty approved the study protocol (20-12-6417) and informed consent was obtained from all patients.

#### Funding sources

This work was supported by Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: 19L0415003) (<http://bap.ankara.edu.tr/>) and the Turkish Oncology Group (TOG).

#### Authors' contributions

Aysegül Yucel Polat: Conceptualization, Methodology, Validation,

Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft. Ebru Sebnem Ayva: Investigation Hakan Gurdal: Investigation Binnaz Handan Ozdemir: Investigation Bala Gur Dedeoglu: Conceptualization, Project administration, Funding acquisition, Writing - Review & Editing.

#### Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153435>.

#### References

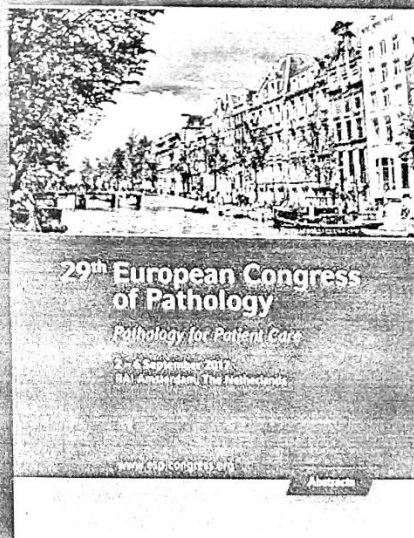
- [1] P. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424, <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] A.G. Waxman, D. Chelomov, T.M. Darragh, H. Lawton, A.B. Moolchick, Revised terminology for cervical histopathology and its implications for management of high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix, *Obstet. Gynecol.* 120 (2012) 1465–1471, <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31827001d5>.
- [3] M. Motamed, G. Bohner, H.H. Neumann, R. von Wazielewski, CIN III lesions and regression: retrospective analysis of 635 cases, *BMC Infect. Dis.* 15 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1277-1>.
- [4] L.-A. MacFarlane, P.R. Murphy, MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer, *Curr. Genomics* 11 (2010) 537–561, <https://doi.org/10.2174/156920210793175595>.
- [5] T. Liolios, S.L. Kastera, G. Colombo, MicroRNAs in female malignancies, *Cancer Inform.* 10 (2019), 117693511902874, <https://doi.org/10.1177/1176935119028746>.
- [6] J. Hwang, B.H. Min, J. Jang, S.Y. Kang, H. Bae, S.S. Jang, J. Il Kim, K.M. Kim, MicroRNA expression profiles in gastric carcinogenesis, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32782-0>.
- [7] M. Jung, A. Schaefer, I. Steiner, C. Kempensteffen, C. Stephan, A. Erbersdobler, K. Jung, Robust MicroRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples, *Clin. Chem.* 56 (2010) 990–1006, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.141500>.
- [8] B. Ortiz-Quintero, Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers, *Cell Prolif.* 49 (2016) 281–303, <https://doi.org/10.1111/cpr.12362>.
- [9] R. Edgar, Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 207–210, <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.207>.
- [10] G. Rustici, N. Kolesnikov, M. Brandini, T. Burdett, M. Dylag, I. Emam, A. Farne, E. Hastings, J. Ison, M. Keays, N. Kurbatova, J. Malone, R. Mani, A. Mupo, R. P. Pereira, E. Pilicheva, J. Rung, A. Sharma, Y.A. Tang, T. Tement, A. Tikhonov, D. Welter, B. Williams, A. Braza, H. Parkinson, U. Sarkkanen, ArrayExpress update: trends in database growth and links to data analysis tools, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 987–990, <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1174>.
- [11] W. Mo, C. Tong, Y. Zhang, H. Lu, microRNAs' differential regulations mediate the progress of Human Papillomavirus (HPV)-induced Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN), *BMC Syst. Biol.* 4 (2010) 4, <https://doi.org/10.1186/12918-015-0145-3>.
- [12] S.M. Witting, P.J.F. Snijders, W. Verlaet, A. Jaspers, M. van de Wiel, W.N. van Wieringen, G. A. Meijer, G.G. Kenter, Y. Yi, C. le Sage, R. Agami, C.J.L.M. Meijer, R. D.M. Steenbergen, Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis, *Oncogene* 32 (2013) 106–116, <https://doi.org/10.1038/onc.2012.20>.
- [13] P.M. Pereira, J.P. Marques, A.R. Soares, L. Carreto, M.A.S. Santos, MicroRNA expression variability in human cervical tissues, *PLoS One* 5 (2010), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011780>.
- [14] J.A. den Boon, D. Pyeon, S.S. Wang, M. Horvillat, M. Schiffman, M. Sherman, R. E. Zunag, Z. Wang, S.M. Hewitt, R. Pearson, M. Schott, L. Chung, Q. He, P. Lambert, J. Walker, M.A. Newton, N. Wentzen, P. Ahlquist, Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: role of stromal estrogen receptor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) E3255–E3264, <https://doi.org/10.1073/pnas.1509322112>.
- [15] M.M. Caffarel, A. Chattopadhyay, A.M. Araujo, J. Bauer, G.G. Scarpini, N. Coleman, Tissue transglutaminase mediates the pro-malignant effects of oncostatin M receptor over-expression in cervical squamous cell carcinoma, *J. Pathol.* 231 (2013) 168–179, <https://doi.org/10.1002/path.4222>.
- [16] Y. Otemur, T. Bekmez, A. Aydog, I.G. Yulug, B.G. Dedeoglu, A ranking-based meta-analysis reveals let-7 family as a meta-signature for grade classification in breast cancer, *PLoS One* 10 (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126357>.
- [17] I.S. Vlachos, K. Zagganas, M.D. Paraskevoudou, G. Georgakilas, D. Karaghouni, T. Vergoulis, T. Dalamagas, A.G. Hatzigeorgiou, DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W460–W466, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>.
- [18] Y. Chen, X. Wang, MiRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) D127–D131, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>.
- [19] H. Dweep, C. Sticht, P. Pandey, N. Gretz, MiRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes, *J. Biomed. Inform.* 44 (2011) 839–847, <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2011.05.002>.
- [20] J.C. Oliveros, An Interactive Tool for Comparing Lists With Venn Diagrams, [Internet], 2007.
- [21] M. Goldman, B. Craft, M. Hartie, K. Repelka, A. Kamath, P. McDade, D. Rogers, A. N. Brooks, J. Zhu, D. Hausler, The UCSC Xena platform for cancer genomics data visualization and interpretation, *BioRxiv* (2019), 326470, <https://doi.org/10.1101/326470>.
- [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method, *Methods* 25 (2001) 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [23] M. da C.G. Leão, E.C. Campos Coimbra, R. de C.P. de Lima, M. de L. Guimarães, S. de A. Heráclio, J. da C. Silva Neto, A.C. Arios de Freitas, Quantifying mRNA and microRNA with qPCR in cervical carcinogenesis: a validation of reference genes to ensure accurate data, *PLoS One* 9 (2014), e111021, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111021>.
- [24] Y. Li, K.V. Kowdley, MicroRNAs in common human diseases, genomics, *Proteomics Bioinform.* 10 (2012) 246–253, <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2012.07.005>.
- [25] Y. Li, Munish Kumar, Zhongxin Lu, Apana Agha L. Takwi, Weiqun Chen, Natalie S. Callander, Kenneth S. Ramos, Ben H. Young, Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by MicroRNAs, *Oncogene* 30 (2011) 843–853, <https://doi.org/10.1016/j.phybeh.2017.03.040>.
- [26] M.J. Bueno, M. Malumbres, MicroRNAs and the cell cycle, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812 (2011) 592–601, <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2011.02.002>.
- [27] J. Liu, T. Lichtenberg, K.A. Hoadley, L.M. Pizozon, A.J. Lazar, et al., An integrated TOGA pan-cancer clinical data resource to drive high-quality survival outcome analytics, *Cell* 173 (2018) 400–416, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.052>.
- [28] Y. Zou, L. Jing, Identification of key modules and prognostic markers in adrenocortical carcinoma by weighted gene co-expression network analysis, *Oncol. Lett.* 18 (2019) 3673–3681, <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10725>.
- [29] B.P. De Almeida, J.D. Apolônio, A. Binnie, P. Castelo-Branco, Roadmap of DNA methylation in breast cancer identifies novel prognostic biomarkers, *BMC Cancer* 19 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s12958-019-5403-0>.
- [30] M. Székely, Z. Kahan, T. Coont, A myriad of roles of miR-25 in health and disease, *Oncotarget* 9 (2018) 21500–21612, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24662>.
- [31] C. Calanna, P. Poltronieri, M. Mallardo, The roles of miR-25 and its targeted genes in human cancer. Recent Trends Cancer Biol. Spotlight Signal. Cascades MicroRNAs Cell Signal. Pathways MicroRNAs Cancer Biol., 2018, pp. 129–139, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71553-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71553-7_7).
- [32] N. Sethi, A. Wright, H. Wood, P. Rabbitt, MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research, *Eur. J. Cancer* 50 (2014) 2619–2635, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.07.012>.
- [33] X. Wang, H.-K. Wang, Y. Li, M. Hafner, N.S. Banerjee, S. Tang, D. Briskin, C. Meyers, L.T. Chow, X. Xie, T. Tsuchi, Z.-M. Zheng, microRNAs are biomarkers of oncogenic human papillomavirus infections, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 4262–4267, <https://doi.org/10.1073/pnas.1401430111>.
- [34] W. Jia, Y. Wu, Q. Zhang, G.E. Gao, C. Zhang, Y. Xiang, Expression profile of circulating microRNAs as a promising fingerprint for cervical cancer diagnosis and monitoring, *Mol. Clin. Oncol.* 3 (2015) 351–358, <https://doi.org/10.3892/mco.2015.560>.
- [35] J.S. Hall, J. Taylor, H.R. Valentine, J.J. Irlam, A. Eustace, P.J. Hoskin, C.J. Miller, C.M. West, Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation, *Br. J. Cancer* 107 (2012) 604–609, <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.294>.
- [36] W.-T. Yang, P.-S. Zheng, Krüppel-like factor 4 functions as a tumor suppressor in cervical carcinoma, *Cancer* 118 (2012) 3691–3702, <https://doi.org/10.1002/cncr.26690>.
- [37] S. Patel, Z.F. Xi, B.Y. Seo, D. McCaughey, J.A. Segre, Klf4 and corticosteroids activate an overlapping set of transcriptional targets to accelerate in utero epidermal barrier acquisition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10660–10673, <https://doi.org/10.1073/pnas.0606581103>.
- [38] J. Jaubert, J. Cheng, J.A. Segre, Ectopic expression of Krüppel like factor 4 (Klf4) accelerates formation of the epidermal permeability barrier, *Development* 130 (2003) 2767–2777, <https://doi.org/10.1242/dev.00477>.
- [39] A.R. Kuhn, K. Schlauch, R. Lao, A.J. Halayko, W.T. Gerthoffer, C.A. Singer, MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells: role of miR-25 in regulation of airway smooth muscle phenotype, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42 (2010) 506–513, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0123OC>.
- [40] X. Ding, T. Zhong, L. Jiang, J. Huang, Y. Xia, R. Hu, MiR-25 enhances cell migration and invasion in non-small-cell lung cancer cells via ERK signaling pathway by inhibiting KLF4, *Mol. Med. Rep.* 17 (2018) 7005–7016, <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8772>.
- [41] T. Wu, H. Hu, T. Zhang, L. Jiang, X. Li, S. Liu, C. Zheng, G. Yan, W. Chen, Y. Ning, Y. Li, Z. Lu, MiR-25 promotes cell proliferation, migration, and invasion of non-small-cell lung cancer by targeting the LAT52/YAP signaling pathway, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019), <https://doi.org/10.1155/2019/9719723>.
- [42] S. Peng, W. Pan, Y. Jin, J. Zheng, MiR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LAT52, *Tumor Biol.* 35 (2014) 12339–12344, <https://doi.org/10.1007/s12277-014-2546-0>.

- [43] H. Zhao, Y. Wang, L. Yang, R. Jiang, W. Li, MiR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RBCK1, *Mol. Cell. Biochem.* 305 (2014) 207–213, <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1329-x>.
- [44] X. Chen, E.M. Whitney, S.Y. Gao, V.W. Yang, Transcriptional profiling of Krüppel-like factor 4 reveals a function in cell cycle regulation and epithelial differentiation, *J. Mol. Biol.* 326 (2003) 665–677, [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01449-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01449-3).
- [45] J. Li, H. Zheng, P. Yu, T. Yu, C. Liu, S. Huang, T.C. Wang, W. Ai, Deficiency of the Kruppel-like factor KLF4 correlates with increased cell proliferation and enhanced skin tumorigenesis, *Carcinogenesis* 33 (2012) 1239–1246, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs143>.
- [46] J.L. Yori, D.D. Seachrist, E. Johnson, K.L. Losada, W.P. Schiemann, R.A. Keri, Krüppel-like factor 4 inhibits tumorigenic progression and metastasis in a mouse model of breast cancer, *Neoplasia* 13 (2011) 601–610, <https://doi.org/10.1593/neo.11260>.
- [47] N. Tiwari, N. Meyer-schaller, P. Arnold, H. Antoniadis, M. Pachkov, E. Van, O. Christofori, Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk3), *PLoS One* 8 (2013), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057329>.
- [48] J. Song, Y. Li, miR-25-3p reverses epithelial-mesenchymal transition via targeting Sema4C in cisplatin-resistance cervical cancer cells, *Cancer Sci.* 108 (2017) 23–31, <https://doi.org/10.1111/cas.13104>.

# VIRCHOWS ARCHIV

## European Journal of Pathology

Volume 471 • Supplement 1 • September 2017



428 • 471(S1) S1-S352 (2017)  
ISSN: 0945-6317 (print)  
ISSN: 1432-2307 (electronic)



using PGM and 46 using 454. The general sequencing artifact level and the artifact level specific for each nucleotide change were determined.

**Results:** Sequencing artifact level was higher in PGM compared to 454. The average noise level was  $0.072 \pm 0.797\%$  and  $0.034 \pm 0.616\%$ , and the 95th percentile was  $0.238\%$  and  $0.128\%$  in PGM and 454, respectively. In both methods the most common nucleotide changes were T>C and A>G. The analytical sensitivity was defined as the 95th percentile of C>T sequencing artifact level ( $0.18\%$  in PGM and  $0.109\%$  in 454) because this is the nucleotide change seen in T790M mutation. Based on these analytical cut-offs, 27 (48 %) and 26 (56 %) cases were T790M positive in PGM and 454 groups, respectively. Across both methods 77 cases had duplicate testing with an agreement rate of 74 %.

**Conclusion:** Deep sequencing methods could be applied to identify low frequency point mutations in ctDNA.

#### PS-10-025

##### Translation initiation separates low and high grade and colon and rectum carcinoma

N. Golob-Schwarzl<sup>1</sup>, C. Koller, S. Krassnig, M. Gogg-Kammerer, N. Gantenbein, H. Bergler, B. Pertschy, S. Uranitsch, M. Holter, A. El-Heliebi, J. Fuchs, A. Punschart, P. Stiegler, M. Keil, J. Hoffmann, D. Henderson, H. Leirach, C. Reinhard, R. Schicho, P. Fickert, S. Lax, J. Haybaeck

<sup>1</sup>Medical University of Graz, Inst. of Pathology, Center for Biomarker Research in Medicine, Austria

**Objective:** Colorectal cancer (CRC) is the third most common cause of cancer related death worldwide. The step of initiation, regulated by eukaryotic initiation factors (eIFs), is assigned as rate limiting step in protein synthesis. eIFs become major targets for cancer therapy and are functionally linked to the PI3K/AKT/mTOR signaling. However, little is known about their contribution in CRC. Therefore, we aimed to investigate the role of eIFs and mTOR members in CRC.

**Method:** eIF and mTOR expression was analysed in primary low and high grade CC and RC samples in comparison to controls without any disease-related pathology on protein and mRNA expression. To assess the therapeutic potential of targeting eIFs, siRNA knockdown experiments in HCT116 cells were performed.

**Results:** Protein and mRNA levels of low grade and high grade CC and RC patients revealed a significant up-regulation of mTOR members and most eIF subunits. Reducing eIF1, eIF5 and eIF6 expression by inducible knockdown in the HCT116 cell line led to increased levels of free ribosomal subunits.

**Conclusion:** Various eIFs are altered; particularly eIF1, eIF5 and eIF6, in low and high grade CC and RC thus aberrant translation initiation might represent a novel mechanism in CRC carcinogenesis.

#### PS-10-026

##### Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples

A. Yücel Polat<sup>1</sup>, Y. Oztemur Islakoglu, A. Aydos, S. Noyan, B. Gur Dedeoglu

<sup>1</sup>Baskent University Medical School, Dept. of Pathology, Ankara University, Biotechnology Institute, Turkey

**Objective:** The aim of this study is to identify miRNAs, which are playing a part in progression of cervical neoplasia by a ranking based meta-analysis approach.

**Method:** Three mRNA and three miRNA expression studies, which include normal, CIN1, CIN3 and SCC samples were selected from Array Express and GEO databases. miRNA studies were

combined with ANOVA dependent ranking based meta-analysis program to find out differentially expressed (DE) miRNAs that can discriminate CIN1, CIN3 and SCC samples from normal samples. The top ten DE miRNAs with the highest ranks in meta-list were selected and their predicted targets were identified by miRDB target prediction tool. mRNA datasets were used for miRNA-target validation and as a test dataset.

**Results:** Among the targets, 26 genes were found to be common with the DE genes between normal and SCC groups from two independent studies. Furthermore, they were used for classification of normal and SCC samples in an independent mRNA test dataset and they were able to classify these two groups with 100 % precision.

**Conclusion:** The meta-analysis results together with validation analysis of their targets may point out the potential roles of miRNAs as biomarkers for the diagnosis and prognosis of cervical cancer.

#### PS-10-027

##### Pre-analytical challenges during RAS testing: Tissue quality and the estimation of tumour cell percentage

K. Dufraing<sup>1</sup>, C. Keppens, A. G. Siebers, G. Kafatos, K. Lowe, G. Demonty, H. van Krieken

<sup>1</sup>KU Leuven, Biomedical Quality Assurance, Belgium

**Objective:** In addition to external quality assessment (EQA), laboratories need tailored feedback about improving biomarker testing practices. A workshop was organised to resolve issues related to the estimation of tumour cell percentage and tissue quality as part of a larger study on neoplastic cell content.

**Method:** Laboratories that failed the 2016 EQA scheme were invited to a workshop to improve RAS testing in Europe. An interactive course about tissue quality took place to stress the importance of the pre-analytical phase. During a microscopic session, five H&E stained tumour tissue slides were discussed and tumour cell percentages estimated. Participants included 4 pathologists, 3 molecular biologists, a technologist and a clinical geneticist from 6 laboratories.

**Results:** Tumour content is checked routinely by visual estimation by the pathologist in 89 % of the 6 laboratories. The average difference between the lowest and highest tumour content estimation was 31 %. The sample with the largest difference (40 %) was considered the most difficult due to inflammatory cell infiltration and necrosis. For non-pathologists this difference was even larger (60 %).

**Conclusion:** This workshop stressed the importance of the pre-analytical phase and provided feedback to the laboratories. Harmonizing tumour cell percentage determination is needed to improve biomarker testing and therefore, further research was initiated.

#### PS-10-028

##### Redox genes expression is down regulated in colorectal adenocarcinoma

L. Carvalho<sup>1</sup>, P. Jegundo, R. Pandeirada, M. Reis Silva, A. Alarcão, A. F. Ladeirinha, V. Sousa, S. Balseiro

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina de Coimbra, Dept. de Anatomia Patológica, Portugal

**Objective:** Oxidative stress plays an important role on colorectal cancer (CRC) development. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione transferase (GPT) are enzymes responsible for the detoxification of superoxide ROS. Although the action mechanisms of these enzymes in CRC is still uncertain. This study aimed to determine MNSOD, SOD3, GSTT1, GSTM1 and GSTP1 expression levels among colorectal cancer subjects.



# Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples

Aysegül Yücel Polat<sup>1,2</sup>, Yasemin Öztürk İslakoglu<sup>1</sup>, Alp Aydos<sup>1</sup>, Senem Noyan<sup>1</sup> and Bala Gur Dedeoğlu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Department of Pathology, Baskent University Medical School, Ankara, Turkey

## ABSTRACT

Gynaecological cancers are common problems in female health. Squamous cell carcinoma (SCC) is a type of these malignancies. This tumor type is derived from pre-cancerous lesions, which is called cervical intraepithelial neoplasia (CIN). CIN is classified as CIN1, CIN2 and CIN3 according to their dysplasia grade in the cervical tissues. miRNAs are small non-coding RNAs that were shown to have important roles in the development and progression of various cancers. The aim of this study is to identify miRNAs, which are playing a part in progression of cervical neoplasia by a ranking based meta-analysis approach. The meta-analysis results together with in silico validation analysis of their targets may point out the potential roles of miRNAs as biomarkers for the diagnosis and prognosis of cervical cancer.

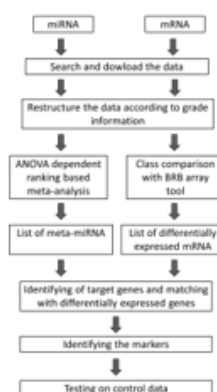
## METHODS

- miRNA and mRNA microarray studies related with cervical cancer were searched in two microarray databases, GEO and ArrayExpress.
- 3 miRNA and 2 mRNA studies were selected for meta-analysis and 1 mRNA study was used as a control (test) data (Table 1).

Table 1. The GEO / ArrayExpress IDs of the studies used for meta-analysis

| GEO / Array Express ID       | No of Normal | No of CIN1 | No of CIN3 | No of SCC |
|------------------------------|--------------|------------|------------|-----------|
| <b>miRNA studies</b>         |              |            |            |           |
| GSE51981                     | 7            | 9          | 8          |           |
| GSE30656                     | 10           |            | 18         | 10        |
| GSE19611                     | 19           | 9          | 5          | 4         |
| <b>Total</b>                 | <b>36</b>    | <b>18</b>  | <b>31</b>  | <b>14</b> |
| <b>mRNA studies</b>          |              |            |            |           |
| GSE65514                     | 24           | 14         | 40         | 28        |
| GSE27678                     | 14           | 11         | 21         | 28        |
| <b>Total</b>                 | <b>38</b>    | <b>25</b>  | <b>61</b>  | <b>56</b> |
| <b>mRNA study as control</b> |              |            |            |           |
| GSE9750                      | 21           |            |            | 33        |

- Three miRNA studies were combined with ANOVA dependent ranking based meta-analysis program which was developed in our laboratory to find out a miRNA signature that can discriminate CIN1, CIN3 and SCC samples from normal samples. The top ten miRNAs with the highest ranks in meta-list were selected for further analysis.
- Predicted targets of these miRNAs were identified by miRDB target prediction tool.
- Two mRNA datasets were selected for finding out differentially expressed genes between CIN1, CIN3, SCC and normal samples. For detecting differentially expressed genes, class comparison tool of BRB-Array Tools was applied to these datasets. After that differentially expressed genes were compared with meta-miRNA-targets and common genes were extracted.
- Differentially expressed mRNAs were validated on a control data for detecting the power of markers.



## CONCLUSIONS

- The meta-analysis results together with validation analysis of their targets may point out the potential roles of miRNAs as biomarkers for the diagnosis and prognosis of cervical cancer.

## RESULTS

### I. List of a subset of meta-miRNAs

Table 2. Top 10 meta-miRNAs and their ranking values.

| miRNA         | the mean of rank | real rank |
|---------------|------------------|-----------|
| hsa-miR-200a* | 33.5             | 1         |
| hsa-let-7i    | 36.5             | 2         |
| hsa-miR-145   | 46               | 3         |
| hsa-miR-150   | 53               | 4         |
| hsa-miR-29a   | 58.5             | 5         |
| hsa-miR-204   | 59               | 6         |
| hsa-miR-25    | 59.5             | 7         |
| hsa-miR-143   | 60.5             | 8         |
| hsa-miR-26a   | 68               | 9         |
| hsa-let-7d    | 78               | 10        |

### II. Prediction of meta-miRNA targets and common gene sets

25 genes were found to be common between meta-miRNA targets and differentially expressed genes between normal, CIN1, CIN3 and SCC groups.

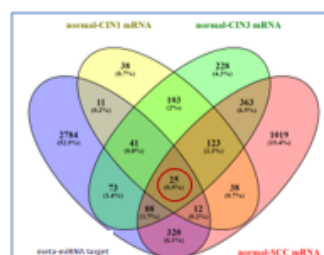


Figure 1. Venn diagram of common genes of meta-miRNA targets and differentially expressed mRNAs. 25 genes were found to be common by Venny [10].

### III. Testing the predictive power of differentially expressed mRNAs as grade markers in the study GSE9750

To test the discriminative power of aforementioned 25 genes, they were used for classification of normal and SCC samples in an independent mRNA test dataset and they were able to classify these two groups with 100% precision.

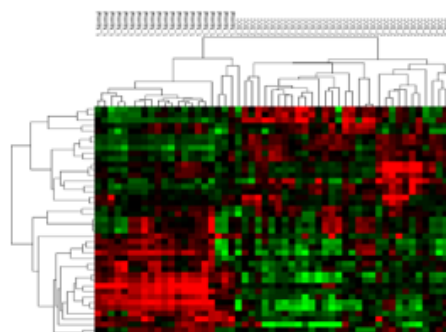


Figure 2 : Hierarchical clustering of the samples and meta-miRNAs.