

T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEMATOLOJİK KANSERLERDE miRNA İFADE DÜZEYLERİ VE TEDAVİYE YANIT ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime SABANCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI

Gaziantep

2014

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

HEMATOLOJİK KANSERLERDE miRNA İFADE DÜZEYLERİ VE TEDAVİYE YANIT ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime SABANCI

Tez Savunma Tarihi: 24.06.2014
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir "Yüksek Lisans" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr.Ahmet ARSLAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Sibel OĞUZKAN BALCI
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir "Yüksek Lisans" tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi	**İmzası**
Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK	
Prof.Dr. Muradiye NACAK	
Prof. Dr. Sibel OĞUZKAN BALCI	

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

05.06.2014

Halime SABANCI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam, Sn. Prof. Dr. Sibel Oğuzkan Balcı 'ya tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı teşekkür ediyorum.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Ahmet Arslan'a, Prof. Dr. Ecir Ali Çakmak'a yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Hematolojik kanser tanısı almış bireylerden kan örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmamıza destek veren Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Pehlivan'a, Uzm. Dr. Handan Haydaroğlu'na ve Hematoloji polikliniği çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans ders ve tez dönemim boyunca hep beraber olduğum değerli arkadaşlarım Ali Can MÜLHİM, Sinem BULGAK, Mehmet ÖZKARSLI ve Merve KAHRAMAN'a teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, gölgesinde huzur bulduğum babama, abime ve kız kardeşime, hayatımın her noktasında beni destekleyen anneme ödenmesi mümkün olmayan emekleri için teşekkür ediyorum.

Her şartta gösterdikleri sevgi ve sabır için sevgili eşime ve ailesine, yaşama sevincim olan kızıma teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
SİMGE ve KISALTMALAR iv
ŞEKİL LİSTESİ v
TABLO LİSTESİ vi
ÖZET 1
ABSTRACT 2
1. GİRİŞ VE AMAÇ 3
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Kanser 5
2.1.1. Hematolojik Kanserler 6
2.1.1.1. Akut Lösemiler 6
2.1.1.1.1. Akut Lösemilerin Moleküler Genetiği 7
2.1.1.2.Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) 8
2.1.1.3. Akut Myeloid Lösemi (AML) 9
2.1.1.3.1. AML'de Kromozomal Tranlokasyonlar 10
2.1.1.3.2 .AML'de görülen nokta mutasyonları 11
2.1.1.4. Kronik Lösemiler 12
2.1.1.4.1. Kronik Myeloid Lösemi (KML) 12
2.1.1.4.2. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) 13
2.1.1.5. Multipl Myelom (MM) 13
2.1.1.6. Lenfomalar 14
2.1.1.6.1. Hodgkin Lenfoma 15
2.1.1.6.2. Non-Hodgkin Lenfoma 15
2.2. miRNA'lar 16
2.2.1. miRNA'ların Keşfi 16
2.2.2. miRNA'ların Sınıflandırılması ve Adlandırılması 16
2.2.3. miRNA'ların Oluşumu 17
2.2.3.4. MiRNA'ların Fonksiyonu 20
2.2.3.5. Translasyonel Gen İfadesini Düzenler 20
2.3. MikroRNA Kanser İlişkisi 22
2.3.1. Tümör Baskılayıcı MiRNA'lar 25

2.3.2. Onkogenik MiRNA'lar....26
2.4. MiRNA'ların Aktivitelerinin Kanserdeki Bozulma Mekanizmaları....28
2.5. MiRNA'larda Mutasyonlar....29
3. GEREÇ VE YÖNTEM....30
3.1. Örneklerin Toplanması....30
3.2. Örneklerin Kodlanması....31
3.3. Gereçler....31
3.3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler....31
3.4. Kandan RNA Eldesi....33
3.5. Poly-A Kuyruğu eklenmesi....34
3.6. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Dönüşümü....35
3.6.1. Primer Listesi....36
3.7. qPCR Gen Ekspresyonu....36
3.8. İstatistiksel Analiz....38
4. BULGULAR....39
4.1. Grupların Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi....39
4.1.1. Tedavi Öncesi, Tedavi Sonrası ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması....40
4.1.2. Tedavi Öncesi ve Sonrasındaki Grupların Karşılaştırılması....44
4.1.3. Tedaviye Yanıt Durumuna Göre Değerlendirme....45
5. TARTIŞMA....51
6. KAYNAKLAR....53
ÖZGEÇMİŞ....69

SİMGE ve KISALTMALAR

AML	: Akut miyeloid lösemi
ALL	:Akut lenfoblastik lösemi
MM	: Multipl myelom
KML	: Kronik miyeloid lösemi
KLL	: Kronik lenfoblastik lösemi
cDNA	:Komplementer DNA
DNA	:Deoksiribonucleik Asit
miRNA	: mikro Ribonükleik Asit
mRNA	: Mesajcı RNA
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi ('Polymerase Chain Reaction')
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
BIM	:Bcl-2-like Protein 11
PTEN	:Fosfotaz Tensin Homolog Protein
PHLP2	:PH Domain and Leucine Rich Pepeat Protein Phosphatase
RISC	: RNA-induced silencing complex
RNA	: Ribonükleik Asit
ROX	: 6-carboxy-x-rhodamine
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'ların sınıflandırılması 18
Şekil 2.2. miRNA'nın işlenmesi. 19
Şekil 2.3. qPCR reaksiyon koşulları.....37
Şekil 4.1. Hastaların tedavi öncesine ait ortalama Cq değerleri.....41
Şekil 4.2. Hastaların tedavi sonrasına ait ortalama Cq değerleri. 41
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait ortalama Cq değerleri.....42
Şekil 4.4. Kontrol grubu ve U6-2 Housekeeping Primeri baz alınarak hesaplanan miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ve miR-92a kat değişim değerleri.....45
Şekil 4.5. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında ayrı ayrı karşılaştırılması..... 47
Şekil 4.6. Tedaviye yanıt vermeyen hastaların tedavi sonrası örneklerinde ortalama Cq değerleri..... 48
Şekil 4.7. Tedaviye yanıt veren hastaların tedavi öncesi örneklerinde ortalama Cq değerleri 48
Şekil 4.8. Tedaviye yanıt veren hastaların tedavi sonrası örneklerinde ortalama Cq değerleri 49
Şekil 4.9. Tedaviye yanıt vermeyen grubun tedavi öncesi ve sonrasındaki ve kontrol gruplarının kat değişim değerleri..... 49
Şekil 4.10. Tedaviye yanıt veren grubun tedavi öncesi ve sonrasındaki ve kontrol gruplarının kat değişim değerleri. 50

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Hematolojik kanserlerde görülen onkogenik(OG) ve tümör baskılayıcı (OS)genler 25

Tablo 3.1. Hematolojik kanser hastalarının yaş,cinsiyet ve tanısı.....30

Tablo 3.2. Tedavi öncesi(TÖ) , tedavi sonrası (TS) hasta gruplarının ve kontrol grubunun (K) kodlanması.....31

Tablo 3.3. Poly-A kuyruğu eklenmesinde kullanılan bileşenler ve miktarları.....34

Tablo 3.4. cDNA reaksiyonları için hazırlanan solüsyon ve miktarı..... 35

Tablo 3.5. cDNA sentezi için reaksiyon içeriği.....35

Tablo 3.6. Kullanılan primerler ve katalog numaraları.....36

Tablo 3.7. qPCR reaksiyonu için gerekli karışım ve miktarları.....37

Tablo 4.1. Tedavi öncesi ve sonrası hasta gruplarının ve kontrol grubunun ortalama Cq değerleri..... 40

Tablo 4.2. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması.....43

Tablo 4.3. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin karşılaştırılması..... 44

Tablo 4.4. Tedavi öncesi ve sonrası hasta gruplarında kat değişim değerleri..... 45

Tablo 4.5. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında ayrı ayrı karşılaştırılması..... 46

Tablo 4.6. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki ortalama Cq değerleri. 47

Tablo 4.7. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasının kat değişim değerleri 49

ÖZET

HEMATOLOJİK KANSERLERDE miRNA İFADE DÜZEYLERİ VE TEDAVİYE YANIT ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime SABANCI
Yüksek Lisans Tezi,Tıbbi Biyoloji ve Genetik Aanabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sibel Oğuzkan Balcı
Haziaran 2014, 69 sayfa

Kan hücrelerinin üretiminden sorumlu olan kök hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması sonucunda hematolojik kanserler ortaya çıkmaktadır. Epigenetik düzenlemede rol alan mikroRNA (miRNA) molekülleri hücre çoğalması, hücre farklılaşması, organogenez, apoptozis gibi hücresel olaylar ile kanser, kalp ve enfeksiyon hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadırlar. MikroRNA'lar hematopoiezisin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir, hematolojik kanserlerde onkogenik ya da tümör baskılayıcı etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli miRNA genlerinin ifade düzeylerinin hematolojik kanser hastalarında tedavi öncesi ve sonrası farklı olduğuna dair bulgular mevcuttur. Ancak farklı toplumlarda geniş hasta grupları ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. Bu araştırmada hematolojik kanserlerde miR-17-92 gen kümesinde bulunan 17, 18a, 19a, 19b, 20a, 92a miRNA ifade düzeyleri ile tedaviye yanıt arasındaki ilişki analiz edildi. Hematolojik kanserlerden akut myelositer lösemi, akut ve kronik lenfoblastik lösemi, Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma tanısı almış olan 24 hastadan tedavi öncesinde ve sonrasında alınan kan örneklerinden ve 33 sağlıklı bireyin kan örneklerinden elde edilen miRNA'ların ifade düzeyleri hibridizasyon temelli mikrodizgi yöntemi ile saptanarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sonuçlar değerlendirildiğinde hastaların tedavi öncesi ve sonrasına ait örneklerinde miR-17-92 gen kümesi üyelerinin ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre artmış olduğu saptandı ($p=0.001$). Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerler karşılaştırıldığında ise miR-19a ve miR-19b'nin tedavi sonrası grupta yüksek olduğu bulundu ($p=0.001$). Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki değerleri analiz edildiğinde; tedaviye yanıt veren grupta yine miR-19a ve miR-19b'de artış saptandı ($p=0.001$, $p=0.009$). Araştırma sonucunda miR-17-92 gen kümesi üyelerinden miR-19a ve miR-19b'nin ifade düzeylerinin tedavi sonrasında artmış olduğu bu nedenle moleküler tedaviyi hedefleyen araştırmalarda yol gösterici olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: miR-17-92 gen kümesi, Hematolojik kanserler, Moleküler tedavi

ABSTRACT

THE RELEATIONSHIP BETWEEN MICRO RNA (miRNA) EXPRESSION LEVELS AND RESPONSE TO TREATMENT IN HEMATOLOGIC MALIGNANCIES

Halime SABANCI
Master of Science Thesis, Department of Medical Biology
Supervisor: Prof. Dr. Sibel Oğuzkan Balcı
June 2014, 69 pages

Hematologic malignancies arise as a result of uncontrolled increase of stem cells that are responsible for blood cell production. Involved in the epigenetic regulation of microRNA (miRNA) molecules that play a role in cellular events such as cell proliferation, cell differentiation, organogenesis, apoptosis, and development of cancer, heart disease and various infectious diseases. MicroRNAs have a critical role in the regulation of hematopoiesis and show oncogenic or tumor-suppressive effect in hematological cancers. In studies, there is evidence about various miRNA genes' expression levels are differences before and after treatment of patients in hematologic malignancies. However, different studies are needed with large patient populations. In this study, expression levels of miR-17-92 gene cluster it covers miR-17, 18a, 19a, 19b, 20a and miR-92a in hematologic malignancies and the association between treatment response is analyzed. miRNAs expression levels obtained from the Blood samples were taken at pre and post-treatment from 24 patients that were diagnosed with Hematologic malignancies of acute myeloid leukemia, acute and chronic lymphoblastic leukemia, Hodgkin's and Non-Hodgkin's lymphoma and 33 healthy blood samples determining by a method of the hybridization-based micro series and compared statistically. Evaluation of the results of the samples before and after treatment of patients, miR-17-92 gene cluster expression levels compared to control group members were found to have increased ($p=0.001$). In comparing the values before and after treatment of mir-19a and 19b, the post-treatment group was found higher ($p=0.001$). Analyzed values before and after treatment of patients who respond to treatment and not also miR-19 and miR-19b were increased in responding to treatment group ($p=0.001$, $p=0.009$). As a result of miR-17-92 gene cluster members miR-19a and miR-19b expression levels increased after treatment so that the molecular theraphy to be conducted for research that may lead.

Key Words: miR-17-92 cluster, hematologic malignancies, molecular theraphy

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, genetik ve çevresel faktörlerle, hücrenin kontrol edilemez biçimde büyüme ve yayılma özelliği kazanması sonucu gelişen bir hastalıktır (1). Mutasyonlar, kimyasalları aktive ve/veya detoksifiye eden enzimlerin yapısını ve ifade edilme düzeyini (karsinojen metabolizmasını) etkileyen kişisel genetik farklılıklar, DNA hasarının onarım kapasitesini etkileyen polimorfik/genetik değişiklikler kanser riskini arttırabilen başlıca genetik faktörlerdir (2).

Hematolojik kanserler, kemik iliğinden türeyen hücrelerde meydana gelen bir grup neoplazmadır. Yapılan çalışmalar, hematolojik tümörlerin büyük bir çoğunluğunun yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu kromozom anomalileri gen ifadesinin bozulmasına ya da yeni bir füzyon proteinin oluşmasına yol açmaktadırlar (3). Hematopoietik neoplazmaların yaklaşık %50'sinde somatik kromozom translokasyonu sonucu bir protoonkogenin aktif hale geçmesi söz konusudur. Bu olay hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki hassas dengenin hücre proliferasyonu lehine dönmesine neden olmaktadır. Kromozom translokasyonu sonucu bir neoplazmanın gelişmesi faktör, bir protoonkogenin onkogen haline dönüşmesi veya bir tümör baskılayıcı genin fonksiyonunu kaybetmesi şeklinde olabilmektedir. Bazen de bir translokasyon sonucu normalde vücutta bulunmayan yeni bir kimerik protein ortaya çıkabilmektedir (4).

Mikro RNA'lar (miRNA'lar), endojen küçük RNA'ların (small RNA) bir sınıfını oluşturan, protein kodlamayan RNA molekülleridir (5). Yaklaşık 20-23 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli miRNA'ların sayısı insanlarda yaklaşık iki bin civarındadır. (6).Bu moleküllerin çeşitli biyolojik olaylarda ve patolojik durumlarda önemli düzenleyici roller aldığı gösterilmiştir. MikroRNA'ların hücresel gen ifadesini transkripsiyonel ve post transkripsiyonel seviyede düzenlediği ortaya konmuştur. (7).Mesajcı RNA (mRNA)'lara hedef genin düşük özgüllükte bağlanmasına, mRNA yıkımına ve translasyonel inhibisyona neden olabileceği için miRNA'lar gen ifadesinin kontrolünde önemli rollere sahiptir (8). MikroRNA'lar özellikle hücre tipinin belirlenmesi ve hücre farklılaşması olmak üzere pek çok fizyolojik işlemde rol alır. Günümüzde birçok hastalıkla ilişkilendirilmiş miRNA'lar

tanımlanmıştır. Örneğin karaciğer, pankreas, özefagus, mide, kolon, prostat, tiroid, göğüs, yumurtalık ve beyin kanserlerinde (9); şizofreni ve Alzheimer hastalığı gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında (10) ve birçok kardiovasküler hastalıklarda (11) farklı ifade profilleri göstermektedir. Çeşitli kanserlerde bazı miRNA'ların onkogen, bazılarının ise tümör baskılayıcı gen gibi işlev görmesi, tümör ilerlemesi, metastazı ve invazyonunda miRNA'ların düzenleyici olduğunu göstermektedir (12).

Protein kodlayan onkogen ve/veya tümör süpresör genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu bilinmektedir. Son yıllarda tümör oluşumunda miRNA'ların da etkili olduğunun gösterilmesi ile kanserin genetik nedenlerinin daha karmaşık olduğu bildirilmiştir. Kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da frajil bölgelerin %50'sinden fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patojenezinde önemli olduğunu ortaya koymuştur (13). Pek çok çalışma miRNA'ların hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde rol aldığını göstermiştir (7). miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin anlaşılmasıyla birlikte, farklı kanser türlerinde özgül hücre tiplerinde miRNA'ların ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiş, miRNA'ların normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir. mRNA ifade profilini belirlemede kullanılan yöntemler aynı zamanda miRNA'ların kanserdeki potansiyel rolünü/rollerini tespit etmek için yapılan çalışmalarda da kullanılmaktadır. Çeşitli miRNA'ların kanser hücrelerinin farklılaşmasında, tümör progresyonu ve metastazında spesifik rol oynadığı gösterilmiştir (12).

Hedef genlerin mesajcı RNA'larına bağlanarak bu genlerin ifadelerini düzenleyen miRNA'ların genetik ve epigenetik etkiler ile kanser gelişim sürecinde rolleri bulunmaktadır. miRNA'ların kanser gelişiminde önemli fonksiyonlarının olması miRNA'ları kanser tedavisinde çekici bir tedavi hedefi haline getirmektedir. Bu çalışmada ;miR17-92 gen kümesinde bulunan 17, 18a, 19a, 19b, 20a, 92a miRNA genlerinin düzeyleri ile hematolojik kanser hastalarının tedaviye yanıtı arasındaki ilişkinin analiz edilmesi hedeflendi. Bu araştırmanın amacı; hematolojik kanserlere yönelik moleküler tedavi geliştirilmesinde yapılacak araştırmalara katkı sağlamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser bugün Dünya'da ve Türkiye'de kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan en sık ölüm nedenidir (14,15). Kanser, günümüz çağdaş tıbbının ve insanının en önemli ve güncel sorunlarındandır(16).

Dünya Sağlık Örgütü'nün, 2008'de yayınladığı "Dünya Kanser Raporu" verilerine göre; küresel çapta 2008'de 12,4 milyon yeni kanser vakası (erkeklerde 6.672.000 ve kadınlarda 5.779.000) ve 7,6 milyon kanser kaynaklı ölüm (erkeklerde 4.293.000 ve kadınlarda 3.300.000) görüldüğü tahmin edilmektedir. Yeni vakaların yarıdan fazlası düşük ve orta gelir grubu ülkelerde görülmüştür. Dünyada akciğer kanseri en yaygın kanser türü ve kanserle alakalı ölüm nedeni iken; kadınlarda en yaygın kanser türü ve kanserle alakalı ölüm nedeni meme kanseridir (17).

Günümüzde kanser etiyolojisi ile ilgili olarak beş faktörün varlığı kabul edilmektedir. Bunlar sırasıyla; genetik, kimyasal, fiziksel, viral ve immünolojik faktörlerdir (18).

Kanserin tedavi yöntemleri genel olarak kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve immünoterapi olup, kanser tanısı konan hastaların bireysel özellik ve hastalık durumuna göre bu yöntemlerden bir veya birkaçı tedavide kullanılmaktadır (19). Bunların yanında son yıllarda moleküler tanı ve tedavi yöntemleri tercih edilmeye başlanmıştır. Doğrudan DNA'yı hedefleyen yöntemlerde DNA hasarına neden olan veya DNA'nın replikasyonunu engelleyen maddeler kullanılmaktadır fakat bu madde ve ilaçlar sadece kanser hücreleri için değil, normal hücreler ve özellikle kök hücrelerin hızlı bölünmesiyle yenilenen hücreler için de toksiktir. Kansere karşı geliştirilen ilaçların normal hücreler üzerindeki bu etkisi, ilaçlara bağlı toksisiteyi belirler ve bu ilaçların kanser tedavisinde etkin biçimde kullanımını kısıtlar. Diğer bir yöntem ise anjiyogenezi (damar oluşumu) engelleyerek tümörün büyümesini durduran maddelerin kullanımıdır. Bu maddeler, özellikle, yeni damarların oluşumunu etkilediğinden normal hücreler için diğer antikanser ilaçlar kadar toksik değildir. Selektif kanser tedavisi yönünden bir başka strateji de, tümör gelişimini hızlandıran onkogenleri doğrudan hedef alan maddelerdir (20). Bu konuda en iyi bilinen örnek, Bcr/Abl füzyon genidir. Kronik miyeloid lösemi (KML) ve akut

lenfosit lösemi (ALL) etyopatolojisinde ve tedaviye yaklaşımdaki rolleri bugün için aydınlatılmış durumdadır ve klinik kullanıma girmiştir. Bcr/Abl füzyon geni oluşumu sonucunda tirozin kinaz aktivitesi apoptozis inhibe olmakta ve hücre proliferasyon uyarılmaktadır (20). İmatinib mesylate isimli ilaç Bcr/Abl füzyon proteinini hedefleyerek inhibe etmektedir (21).

Çeşitli büyüme faktörü reseptörlerini ve hücre uyarı ileti yolağında bulunan protein kinazları hedefleyen inhibitör etkili olası antikanser ilaçlar geliştirilmektedir. Kanser hücresinin apoptoza karşı duyarlılığını arttıran maddeler ile bir çok kanser türünde altta yatan neden olan mutant p53 proteinine bağlanarak onu yeniden aktifleştiren ilaçlar da denenmektedir Moleküler biyolojinin kanser tedavisindeki etkisi ve rolü hakkında çalışmalar devam etmekte olup, onkogenler ile tümör baskılayıcı genlerin ürünlerini hedef alan ilaç tasarımlarının bu konuda önemli bir rol alacağı düşünülmektedir (22).

2.1.1. Hematolojik Kanserler

Kemik iliğindeki öncü hücrelerden; kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri ve plateletler oluşmaktadır. Hematolojik kanserler, kemik iliğinden türeyen hücrelerde meydana gelen bir grup neoplazmadır. Yapılan çalışmalar, hematolojik tümörlerin büyük bir çoğunluğunun yapısal ve/veya sayısal kromozom anomalileri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu kromozom anomalileri gen ifadesinin bozulmasına ya da yeni bir füzyon proteinin oluşmasına yol açmaktadırlar (3). Hastalığın gidişini ve hücre olgunluğunu esas alan Akut-Kronik, kanser hücrelerin köken aldığı hücre tipinin esas alındığı Lenfoid-Myeloid, tutulum bölgesinin esas alındığı kan ve kemik iliği bölge tutulumu ön planda (lösemi), doku tutulumunun ön planda olması (lenfoid kökenlilere lenfoma, myeloid kökenlilere granülositik sarkom) özelliklerini değişik kombinasyonlarda birleştirerek, hematolojik kanserleri sınıflandırmak mümkündür (23).

2.1.1.1. Akut Lösemiler

Akut lösemiler kemik iliğinin klonal, kanser hastalıklarıdır. Akut lösemilerde kök hücrede gelişen patolojiler sonucunda olgunlaşma yeteneğini yitirmiş ve kontrolsüz bir şekilde hızla çoğalan hücreler (blastlar) gelişir. Bu hücreler kemik iliginde normal

kan hücrelerinin yerini alarak kan elemanları olan eritrositler, granülositler ve trombositler yapımını engellerler. Hızla artan blastlar kemik iliği, kan, dalak, lenf bezleri ve diğer dokulara yayılarak organlarda fonksiyon bozukluklarına yol açarlar (24).

Akut lösemiler tanı koydurucu hücreleri blastlara göre Akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve Akut miyeloid lösemi (AML, aynı zamanda Akut Nonlenfoblastik Lösemi: ANLL olarak da isimlendirilir.) olarak iki büyük alt gruba ayrılırlar. İkinci adım olarak alt grupların ayrımı yapılmalıdır. Akut lösemilerin biyolojik olarak farklı gruplarda sınıflaması, morfoloji, sitokimya ve imünofenotipleri ile sitogenetik ve moleküler tekniklere göre yapılır (24). ALL genellikle çocuklarda görülür. AML, çoğunlukla bir erişkin hastalığıdır ve insidansı yaşla birlikte artar. Her iki tip lösemi kadınlara göre erkeklerde daha sıktır, bu sıklık ileri yaşlarda daha belirgindir (25).

2.1.1.1.1. Akut Lösemilerin Moleküler Genetiği

Lösemiler, kan hücrelerinin gelişim, olgunlaşma ve homeostasiz sürecinde rol oynayan genlerin genetik ya da epigenetik olarak hatalı çalışmaları sonucu gelişirler (26).

Gen ifadesinin çeşitli basamaklarının engellendiği ya da bütünüyle bozulduğu durumlarda ortaya çıkan lösemiler iki grupta toplanabilir. İlki, gen füzyonudur ve farklı bir proteinin genellikle bir transkripsiyon faktörü ya da reseptör tirozin kinazın (RTK) ilgisiz bir protein ile birleşerek kimerik bir protein oluşturmasıdır. Bu kimerik protein onkoprotein özelliğindedir (26). Miyeloid lösemilerin büyük bir çoğunluğunda t(9;22), translokasyonu sonucunda bcr/abl kimerik geni oluşmakta ve 22 numaralı kromozomda olan bu değişimden sonra "Philedelphia kromozomu" olarak adlandırılmaktadır. Bir diğer mekanizma ise, bir genin ifadesinin kontrolünün başka bir genin düzenleyici bölgeleri tarafından kontrol altına alınmasıdır ve bu durum bir gen aktivasyon mekanizması olarak bilinmektedir. Bu mekanizma genellikle immünglobulin (Ig) ya da T hücre reseptörlerinin gen kontrol bölgelerinde görülmektedir (27). Gen aktivasyonuna neden olan kromozomal translokasyonlar lenf dokularında meydana gelir ve böylece gen ifadesinin kontrolü bozulur. Bu mekanizmaların dışında diğer genetik ve epigenetik mekanizmalar örneğin tümör baskılayıcı genlerde ya da onkogenlerde görülen nokta mutasyonlar, gen delesyonları

ve DNA metilasyonu löseminin başlaması ya da gelişmesine neden olabilmektedir (26). B hücreli kronik lenfositik lösemide, kanserlerin genelinde gözlenen ve bir tümör baskılayıcı gen olan p53 mutasyonları tespit edilirken, plazma hücreli lösemilerde ise en iyi bilinen onkogenlerden N-Ras ve K-Ras genlerini aktive edici mutasyonlar en sık genetik değişiklikler olarak tespit edilmektedir. Lösemilerin moleküler biyolojisi hakkında yapılabilecek diğer bir genelleme de diğer kanserlerde olduğu gibi lösemilerin tek bir hücreden geliştikleri yani klonal çoğalmalarıdır (27). Kanser klonunun baskın hale gelmesi normal klonlara göre daha hızlı ve dirençli bir şekilde çoğalması ile mümkün olur. Bu nedenle lökomogenezin en az iki basamaklı bir süreç olduğu hipotezi ileri sürülmüş ve bu süreçte lösemi hücrelerinin klonal olarak çoğalabilmesi için farklılaşmanın engellenmesi ve aşırı çoğalma gibi hücresel basamakların aşılması gerektiği gözlenmiştir (28). Lösemilerde görülen translokasyonların büyük çoğunluğunun hematopoetik farklılaşmada rol oynayan transkripsiyon faktörlerini etkilediği gösterilmiştir. Bu faktörlerden biri "core binding factor"(CBF) olup ya bu gen kromozomların kırılma noktalarında bulunarak, ya da translokasyon sonucunda oluşan kimerik protein tarafından fonksiyonel olarak etkisiz hale getirilebilmektedir. AML'de görülen bir translokasyon sonucunda, retinoik asit reseptörünü kodlayan RAR alfa geni PML geni ile birleşerek PML/RAR alfa onkogeni oluşturmakta ve sentezlenen yeni protein hücre farklılaşmasını engellemektedir. Her ne kadar farklılaşmanın engellenmesi lökomogenez için temel bir basamak ise de PML/RARA translokasyonu oluşturulmuş fareler üzerinde yapılan çalışmalarda tek başına bu anormalliğin lösemi gelişimine yol açmadığını göstermiştir. Hızlı çoğalma basamağının ise RTK geninin aktivasyonu ile sağlandığı ileri sürülmüştür. Büyüme faktörlerinden FLT3 ve c-kit genlerinde görülen mutasyonların sıklıkla AML vakalarında gösterilmiş olması da bu iki basamaklı lökomogenez hipotezini desteklemektedir(29).

2.1.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Normal lenfoid hücre topluluğu, immünglobin ve T hücre reseptörü genlerinin farklı ve klonal yeniden yapılanma sürecini geçirerek, B ve T hücrelerin çoğalma ve farklılaşma sürecini tamamlar. Bu sürecin herhangi bir safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler hücre bölünmesinin bozulmasına, klonal olarak hücre popülasyonunda artışa ve ALL'ye neden olur. Somatik olarak meydana gelen çoklu

genetik değişiklikler bu sürece neden olmaktadır. ALL'lerin yaklaşık % 75'inde kromozomal translokasyonlar mevcuttur.

Her lösemide en azından bir hastalık için özgül, "klonal" bir genin yeniden düzenlenmesi vardır ve hastalığın takibinde belirteç olarak kullanılabilir. T ya da B hücre kaynaklı ALL'de "minimal rezidüel hastalık" (MRH) tespiti için iki tip özgül belirteç ile analiz imkanı vardır. Birincisi anormal kromozomal rekombinasyonu sonucu gelişen özgül füzyon bölgelerinin tespiti, diğeri ise Ig ya da T hücre reseptör (THR) genlerinin yeniden yapılanmalarının tespiti şeklindedir. Klinik çalışmaların çoğu hastaya özgül Ig ya da T-hücre reseptörü kullanılarak yapılmıştır (30).

2.1.1.3. Akut Myeloid Lösemi (AML)

Kontrolsüz çoğalan blastlar, kemik iliği, lenfatik dokular, karaciğer ve merkezi sinir sistemi (MSS) gibi hayati organlarda fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir. (31). Akut lösemiler, lenfoid veya miyelositer serinin tutulumuna göre başlıca 2 ana gruba ayrılır. Akut lenfoblastik lösemilerin (ALL) % 80'i çocuklarda görülür ve erişkin ALL'lere göre daha iyi prognoza sahiptir. Buna karşın AML' lerin % 90'ı erişkinlerde ortaya çıkar. AML'deki kanser hücreleri daha çok monosit veya miyeloid farklılaşma gösteren blastlardır. Yüzde 5-10'unda megakaryositik veya eritroid farklılaşma görülebilir (31).

AML tüm kanserlerin % 1'ini oluşturur. Görülme yaşı ortalama 60'dır. Görülme oranı gelişmiş ülkelerde ve endüstrileşmiş şehirlerde yüksektir. Genetik faktörler AML'nin etiyolojisinde rol almaktadır. Tek yumurta ikizlerinin birinde 10 yaşından önce lösemi gelişirse; diğer ikizinde 1/5 olasılıkla lösemi gelişebileceği rapor edilmiştir. Trizomi 21 (Down), trizomi 13 (Patau) ve XXY (Klinifelter) gibi somatik hücre kromozom anomalisi olan birçok sendromda AML görülme riskinin arttığı bilinmektedir. Bloom Sendromu, Monozomi 7, Fanconi Anemisi ve Ataksia Telenjektazia gibi birçok otozomal resesif hastalıkta akut lösemi oluşturmaya eğilimli kromozom düzensizlikleri saptanmıştır (25).

Başka bir kanser tanısı sonrasında görülen lösemilere sekonder lösemi adı verilir. Bunun en iyi bilinen ve en sık rastlanan örneği Hodgkin Hastalığı sonrası görülen lösemilerdir. Sekonder kanser gelişiminde, lökomojenik ilaçlar, radyoterapi ve

kişinin bağışıklık sisteminin rolü vardır. Kronik miyelositik lösemi (KML), miyelodisplastik sendrom (MDS) ve paroksimal noktural hemoglobinüri (PNH) gibi bazı hematolojik hastalıklar, doğal seyri sırasında AML'ye dönüşebilmektedir (25).

2.1.1.3.1. AML'de Kromozomal Tranlokasyonlar

AML'de görülen translokasyonların çoğu kimerik füzyon gen ürünü oluşturur.

Core binding faktör(CBF): CBF grubundaki genler birçok dokunun farklılaşmasında rol oynayan çeşitli hedef genlerle heterodimer oluşturarak işlev görür. DNA'ya bağlanarak işlev gören alfa ve DNA'ya bağlanmadan transkripsiyonel aktiviteyi artıran beta alt üniteleri vardır. Öncelikle t(8;21), AML1-ETO translokasyonu tespit edilmiş olup, buradaki AML1 geni CBF'nin DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatma özelliğine sahip alfa1 alt grubunun üyesidir. Kromozom 16 inversiyonu sonucu fonksiyonu değişen diğer bir CBF'de, CBF betadır. Burada CBFB/MYH11 füzyonu söz konusudur. Her iki translokasyon da hematopoezi bozarlar ama tek başlarına AML başlatmaya yeterli değillerdir (32).

Retinoik asit reseptör alfa(RARA): t(15;17) ve t(11;17) translokasyonları sonucu 17. kromozomda bulunan RARA geni 15. kromozomda bulunan PML geni ile birleşerek PML/ RARA füzyon geni ya da 11. kromozomda lokalize PLZF füzyon geni oluşur. Her iki durum da retinoik asit tarafından sağlanan transaktivasyon dominant negatif olarak bloke edilir. Bu durum fenotipik olarak gelişimin promyelositik safhasında durmasına neden olur. Tedavide kullanılan ATRA'nın etkisi, ilacın PML/RARA füzyon proteinine bağlanarak hematopetik farklılaşmada olan bu blokajı kısmen kaldırmasıyla olur. Ancak yine CBF mutasyonları gibi, RARA mutasyonlarının da lösemi gelişimi için başka mutasyonların da katkısına gereksinimleri vardır. Translokasyon t(15;17), AML'nin üç alt gurubuna özgül olup olguların % 95'inde tanı sırasında pozitiftirler (33).

Kromozom 11q23 bölgesini içeren translokasyonlar AML yanında ALL'de de görülür. Otuzdan fazla gen bu bölgede bulunan MLL geni ile translokasyon yapar. Bu durum 1 yaş altı infant lösemilerinde en sık görülen genetik değişikliktir. Ayrıca yine tedaviye bağlı sekonder lösemilerde de kromozom 11q23 anomalilerine sıklıkla

rastlanır. MLL geninin yer aldığı t(4;11) translokasyonunun tüm akut lösemiler için prognostik özellikte olduğu kabul edilmektedir (33).

HOX gen ailesine ait genler omurga gelişimi ve hematopoezde önemli rol oynarlar. HOX genlerinin ifadesi hematopoezde kontrol edilmektedir. AML'de HOX genleri, çeşitli tipleriyle MLL geni ile translokasyon yapmaktadır. Burada HOX genlerindeki sorun, hematopoezi düzenleyici fonksiyonunu kaybetmeleridir. Bunun dışında HOX genlerini hedefleyen kromozomal translokasyonlar arasında t(7;11) NUP98-HOXA9 ve t(2;11) NUP98-HOXD13 sayılabilir. Son çalışmalar bu translokasyonların hematopoetik öncül hücrelerin fonksiyonunu kısmen bozduğunu ancak lösemi gelişimi için tek başına yeterli olmadığını göstermiştir (34).

2.1.1.3.2. AML'de görülen nokta mutasyonları

Ras gen ailesi mutasyonları; onkogenik Ras mutasyonları AML ve MDS'de görülür. Tipik olarak N- ve K-Ras genlerinin 12, 13, ya da 61. kodonlarında olur. Bu mutasyonların sıklığı farklı çalışmalarda değişmekle beraber % 25-44 arasındadır. Yapılan çalışmalarda reseptör tirozin kinazları aktive edici mutasyon varlığının kötü prognozla birlikte olduğu gösterilmiştir (35).

Reseptör tirozin kinazları aktive edici mutasyonlar; AML olgularının oldukça yaygın bir bölümünde FLT3 ve c-KIT geninde aktive edici mutasyonların varlığı gösterilmiştir. BCR/ABL pozitif olgularda ABL-tirozin kinaza karşı geliştirilen moleküler hedef tedavisindeki başarı sonrası, AML için de yukarıdaki hedefler kullanılarak benzer tedavi stratejilerinin oluşturulması için çalışmalar sürdürülmektedir (36). FLT3, bugün için AML'de en sık mutasyona uğrayan gendir (yaklaşık %30-35). Olguların yaklaşık %20-25'inde genin bir bölgesinin (juxtamembrane domain) duplikasyonu (internal tandem duplication-ITD) genin aktive olmasına neden olur. Bu mutasyonla genin otoinhibitör bölgesinin hasara uğradığı ve kinaz aktivitesinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (35). Olguların yaklaşık % 5-10'unda ise genin D835. pozisyonunda "aktive edici loop" bölgesinde oluşan nokta mutasyonu yine tirozin aktivitesine neden olabilmektedir. Hem pediatrik, hem de erişkin grubunda yapılan çalışmalar FLT3 mutasyonlarının AML hastalarında kötü prognozla birliktelik gösterdiğini bildirmektedir. FLT3 mutasyonları önceki bölümde

bildirilen diğer kromozomal translokasyonlarla birlikte aynı olguda görülebilmektedir(36). AML olgularının yaklaşık % 5'inde c-KIT geninin D816 pozisyonu mutasyonları bildirilmektedir. Bu mutasyon da yine genin aktive edici loop bölgesinde olup genin kinaz aktivitesini artırmaktadır (37).
FLT3, KIT ve Ras mutasyonlarının tümü AML olgularının yaklaşık % 50'sinde görülmektedirler. Hastaların diğer kısmında da sinyal iletim sisteminin aktive olmasını sağlayacak başka genlerin mutasyonlarının varlığı olasıdır (37).

AML1, CEBPA, GATA1 mutasyonları; AML1 geni lösemilerde sıklıkla translokasyona uğramakla birlikte, bazı AML olgularında genin fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar gösterilmiştir. Bunun yanında olguların % 3-5'lik bir bölümünde AML1 mutasyonları da tespit edilmiştir. Bunlar daha çok AML1 ve trizomi 21 ile birlikte görülen AML olgularıdır. CEBP alfa geni normal myeloid gelişim için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Bir çok translokasyon yanında, yine bu genin de fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar görülmektedir.
GATA1 gen mutasyonları akut megakaryoblastik lösemiler, ve özellikle trizomi 21-Down sendromunda gelişen lösemilerde görülmektedir. Bu mutasyonla GATA1 geninde fonksiyon kaybı olmaktadır (35).

2.1.1.4. Kronik Lösemiler

Kronik lösemilerde; kanserleşen hücreler daha olgun lökositlerdir. Kronik miyeloid (granülositik) lösemi (KML) ve kronik lenfoid (lenfositik) lösemi (KLL) olmak üzere iki gruptan oluşurlar (24).

2.1.1.4.1. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

KML; lösemilerin %15'ini oluşturur. Hematopoetik kök hücrenin neoplastik dönüşümü sonucu gelişir. Hastalık belirgin klinik safhalar halinde görülür. Granülositlerin artması, beraberinde eritroid ve trombositik hiperplazisiyle karakterize genellikle erişkin yaş hastalığıdır (38) ve erkeklerde daha sık görülür. KML'yi diğer lösemilerden ayıran en önemli özellik, Philadelphia kromozomunun kök hücre kinetiğini bozarak hastalığın gelişmesine neden olmasıdır (39). Karyotip analizinde ise Philadelphia kromozomu tespit edilir (40).

KML' de hastalığın tamamen ortadan kaldırılması ancak allojenik kök hücre nakli ile büyük oranda gerçekleştirilebilir. Hastalığın kronik fazında semptomatik tedavi (örneğin; lökoferez, idrar miktarının arttırılması) uygulanır. Spesifik tedavi de genellikle kronik fazda blastları ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için kemoterapik ajanlar ve interferon alfa ile sağlanmaktadır (41).

2.1.1.4.2. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Kronik lenfositik lösemiler proliferasyon yeteneğini yitirmiş ve olgun görünümlü lenfositlerin kan, kemik iligi, lenf nodu, dalak ve diğer organlarda birikmesi ile karakterize neoplastik hastalıklar grubudur. 50 yaş üzerinde ve erkeklerde daha sık görülür. Birincil lenfositik lösemiler, lösemi /lenfoma sendromları seklinde sınıflandırılır ve hücre kökenlerine göre B ve T hücreli olarak gruplara ayrılırlar. Kronik lenfositik lösemilerin en sık görülen tipi KLL' dir (42).

Kimyasallar, radyasyon, diyet, virüs enfeksiyonu ve otoimmün hastalıkların KLL gelişmesinde önemli bir risk olduğu kesin olarak bugüne kadar gösterilememiştir.

Bazı çalışmalar KLL hücrelerinde somatik kromozom bozukluğu ve tek bir gende (p53 ve ATM genleri gibi) mutasyon olduğunu göstermiştir. Fakat bu kişilerin ve ailelerinin üyelerinde aynı gende somatik bir değişiklik saptanamamıştır. KLL olan kişilerin ailelerinde diğer hematolojik kanser lezyonların örneğin lenfoma ve multipl miyelom hastalığının normal kişilere göre daha sık olduğu da bilinmektedir. (43). KLL, yetişkin populasyonda en sık görülen lösemi tipidir (44).

2.1.1.5. Multipl Myelom (MM)

Multipl myelom (MM), kemik iliğinde plazma hücre artışı ve bu hücrelerin salgıladığı M proteinlerin serum ve/veya idrarda bulunmaları ve litik kemik lezyonları ile karakterize bir hastalıktır. Görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve 60-70 yaşlarında en yüksek orana ulaşır. Multipl myelom erişkinlerde görülen kanserlerin % 1'ini, hematolojik kanserlerin ise % 10'unu oluşturmaktadır (45).

Bu hastalığı diğer lenfomalardan ayıran önemli biyolojik tümör karakteristikleri vardır. Miyelom hücreleri, tanı ve hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi açılarından büyük önem taşıyan bazı özellikleri gösterirler (46).

MM, etyolojisi bilinmeyen bir hastalıktır. Diğer kanserlerde olduğu gibi radyasyon, çalışma alanları, hayat tarzı ve öncü medikal problemlerle bu hastalık ilişkilendirilmek istenmiştir. Nükleer iş kollarında çalışanlarda hastalığın oluşumunda radyasyona maruz kalma süresi önemlidir, fakat tanı ve tedavi amaçlı radyasyona maruz kalma ile MM oluşumunu ilişkilendirecek bir bulgu henüz yoktur. Tarım ve metal işçiliği, obezite, kötü sosyo-ekonomik koşullar, bazı verilere göre özellikle siyah renkli saç boyası myelom riskini artıran faktörler olarak belirlenmiştir. Benzene maruz kalma, sigara ve alkol, myelom için risk faktörü oluşturmamaktadır. AIDS'de diğer kanserlerde olduğu gibi myelom görülme sıklığında da artma mevcuttur (47).

B hücre kökenli kanserlerde olduğu gibi myelom plazma hücreleri de germinal merkez veya post germinal merkez kaynaklı hücrelerdir. Multiple myelom patogenizinde siklin-D ifadesinde artma, p16 ve p15 hipermutasyonu, Ras-onkogen mutasyonu, p53 kaybı, c-myc artmış ifadesi gibi hücre döngüsü düzenleyicilerindeki değişiklerin yanında kemik iliği mikro çevre ilişkileri de önemli rol oynamaktadır (47).

Myelom iyileşemeyen bir hastalık olmasına rağmen kemoterapi ve özellikle kök hücre nakli, yaşam süresinin ve kalitesinin belirgin bir biçimde artmasını sağlar (48).

2.1.1.6. Lenfomalar

Lenfomalar, lenf sistemini oluşturan hücrelerden kaynaklanan bir hastalıktır. Lenfoid dokuları tutan bir hastalık olmasına rağmen gastrointestinal sistem, akciğer, kemik gibi çeşitli doku ve organlardan kaynaklanabilir. En belirgin bulgusu lenf bezlerinin ağrısız büyümesidir. Hodgkin ve Non Hodgkin Lenfoma (NHL) olarak iki ana gruba ayrılırlar (47, 49).

2.1.1.6.1. Hodgkin Lenfoma

Yaklaşık 150 yılın üzerinde geçmişi olan, lenf bezi ve dalak hastalığıdır. Mevcut tedavi yöntemleri ile tamamen iyileşebilir olması hastalığı diğer hematolojik kanserlerden ayıran en önemli özelliklerden birisidir. 15-35 yaş arası ve 50 yaş üzeri hastalığın en sık gözlendiği iki dönemdir. Siyah ırkta beyaz ırka göre ve erkeklerde

kadınlara oranla görülme sıklığı artar (47, 50). Hodgkin hastalığında lenfatik yolla diğer organlardaki lenf bezlerine yayılım söz konusudur (51).

Hastalığın etiyolojisi kesin olarak bilinmemesine rağmen Ebstein Barr Virüs (EBV) ile ilişkisi kanıtlanmıştır. HIV ile enfekte olanlar, tonsillektomi geçirenler, az çocuklu ve yüksek sosyo-ekonomik düzeye sahip ailelerin çocuklarında Hodgkin Lenfoma görülme riski artar. Bunların yanı sıra çevresel ve genetik faktörler de etken olmaktadır. Bazı ailelerde birden fazla kişide görülebilir (51).

2.1.1.6.2. Non-Hodgkin Lenfoma

Lenf sistemini oluşturan hücrelerden kaynaklanan bir hastalıktır. Morfolojik, immünfenotip, genetik ve klinik özelliklerine göre sınıflandırılırlar (47).

Yaşlılarda ve erkeklerde daha sık görülür. Nedeni tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda infeksiyöz ajanlar, kimyasal maddeler ve tıbbi tedaviler etken olarak gösterilmektedir. EBV, HIV, Hepatit C, helikobakter pilori gibi enfeksiyonlar çeşitli NHL hastalıklarına etken olmaktadır (52).

Non-Hodgkin Lenfoma hem lenfatik hem de hematojen yayılım göstererek yalnız lenf nodlarında değil, diğer doku ve organlarda da görülebilir. Genel olarak klinik bulgu ve belirtiler lenfomayı oluşturan hücrenin proliferasyon hızı ve lokalizasyona bağlıdır (48, 53).

Non-Hodgkin Lenfomalar, her zaman tedavi edilebilen ve çoğunlukla da iyileştirilebilen kanserlerdir. Kullanılacak ilaçlar ve yöntemler hastalığın evresine ve tipine göre belirlenir. Bu hastalığın heterojen bir yapıda olması evrelendirilmesinin zor ve karışık olmasına neden olmaktadır (52, 53).

2.2. miRNA'lar

miRNAlar, kodlama yapmayan, tek sarmallı yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğunda olan RNA'lardır. Öncü miRNA'lar birkaç yüz ile bin nükleotid arasında değişen uzun RNA'lardır. RNA polimeraz II enzimi tarafından üretilen öncü miRNA'lar önce kısa miRNA-miRNA dublekslerine, sonra tek sarmallı olgun miRNA'ya

dönüşürler. Olgun miRNA'lar, hedef mRNA dizilerine bağlanıp gen ifadesini transkripsiyon sonrasında ya translasyonu bakılayarak ya da mRNA yıkımını tetikleyerek değiştirirler (54). miRNA'ların hedef mRNA'lara bağlanarak insan genlerinin %30-%90'ının ifadelerini düzenlediği tahmin edilmektedir (55). Son yıllarda bitki, virüs ve hayvan hücrelerinde miRNA'lar keşfedilerek toplam 25141 olgun miRNA'dan 2154'ünün insanlara ait olduğu belirlenmiştir (56,57).

2.2.1. miRNA'ların Keşfi

İlk miRNA, Lee ve çalışma arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuarında keşfedilmiş (58) olup, miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (59). Lee ve arkadaşları 1993 yılında "*Caenorhabditis elegans*"ta yaptıkları çalışmalar sonucunda; lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA ürünü olduğunu saptamışlardır (58). Daha sonra 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları *C.elegans*'da 22 nükleotit uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir RNA keşfetmişlerdir (60). Let-7'nin insanları da içine alan türler arasında korunmuş olduğu keşfedilmiş olup (61), bu durum let-7 nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir. Daha sonraki yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilmiştir ve miRNA'lar olarak isimlendirilmiştir (62).

2.2.2. miRNA'ların Sınıflandırılması ve Adlandırılması

miRNA adlandırılmasında "mir" ön ekinden sonra ilgili türe ait kısaltma ve sayısal bir kodlama bulunmaktadır. Dizi homolojisi olan miRNA'ları adlandırmak için ise miR adından sonra son ek kullanılır. Örn: miR-19a dizisi miR-19b dizileri benzer oldukları için a ve b şekinde ayrılmışlardır. Pre-miRNA'lar ile olgun miRNA'lar birebir aynıdır fakat genomda farklı bölgelerde yerleşime sahiptir. Bu yerleşimi belirtmek için ayrıca bir ön ek ve sayısal adlandırmaya ihtiyaç vardır. Örneğin; hsa-mir-194-1 ve hsa-mir-194-2 pre-miRNA'ları aynı olgun miRNA ile sonuçlandıkları halde genomun farklı bölgelerinde yerleşmişlerdir. (hsa: Homo sapiens) (63-64).
miRNA'ların en büyük özelliklerinden biri, bir öncül diziden köken almaları ve bu öncül dizinin ilmek şeklinde bir yapı içermesidir. miRNA'ların aktif formları

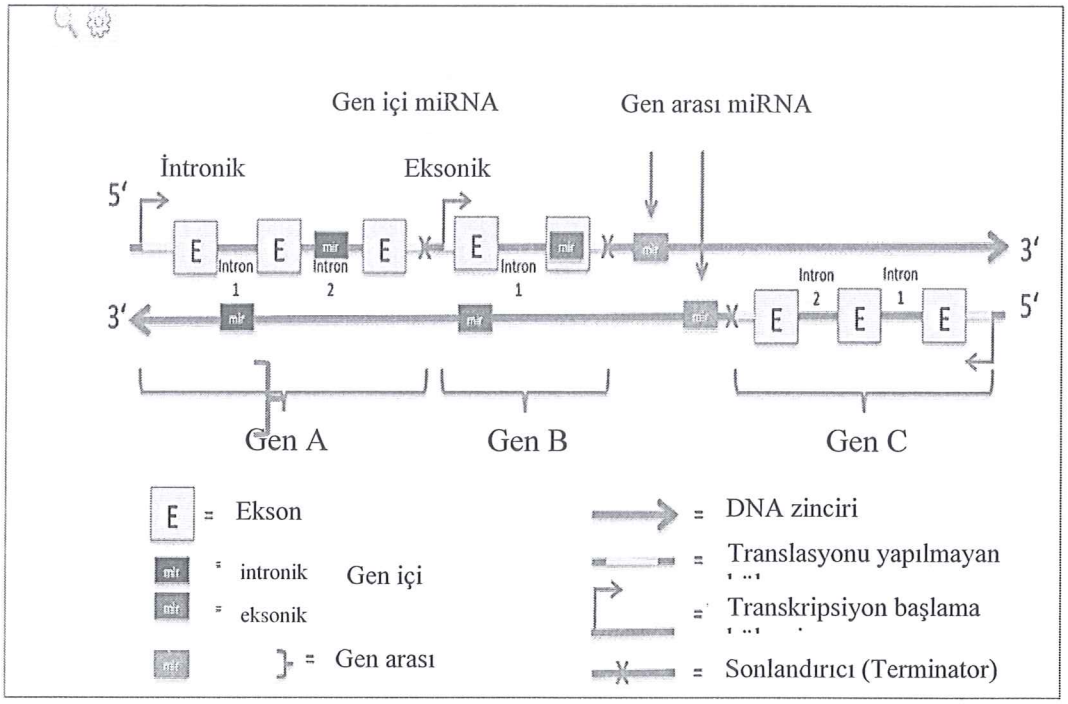
yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundaki tek zincirli RNA moleküllerididir. Yapılan çalışmalar transkripsiyon ünitesi içinde yerleşik olduklarını göstermektedir. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'lar gen içi (intergenik) ve genler arası (intragenik) olmak üzere 2 sınıfa ayrılabilir. Genler arası miRNA'lar; intronik, ekzonik, 3′-UTR miRNA'lar ve 5'-UTR miRNA'lar olmak üzere sınıflandırılabilir (65). Gen içi miRNA genleri bulundukları genin aynı zinciri üzerinde yerleşirken bir kısmı da karşı zincirde yerleşir (Şekil 2.1) (66) .

Bir miRNA geninin genomik dağılımı ve kromozomal yerleşimi onun ifadesini belirleyen bir faktör olması bakımından önemlidir. miRNA genlerinin yaklaşık %60'ı intronlarda yerleşmiştir ve transkripsiyonları yerleşmiş bulundukları gen ile bağlantılıdır (67). miRNA genleri kümeler halinde dağılmıştır, heterozigotluğun kaybolduğu bölgelerde ve amplifikasyon bölgelerinde yerleşiktir. Bu yerleşim, kromozomal düzensizliklerin bulunduğu bölgelerdeki miRNA genlerinin ifadesinin direkt etkilenmesi bakımından önemlidir (67).

2.2.3. miRNA'ların Oluşumu

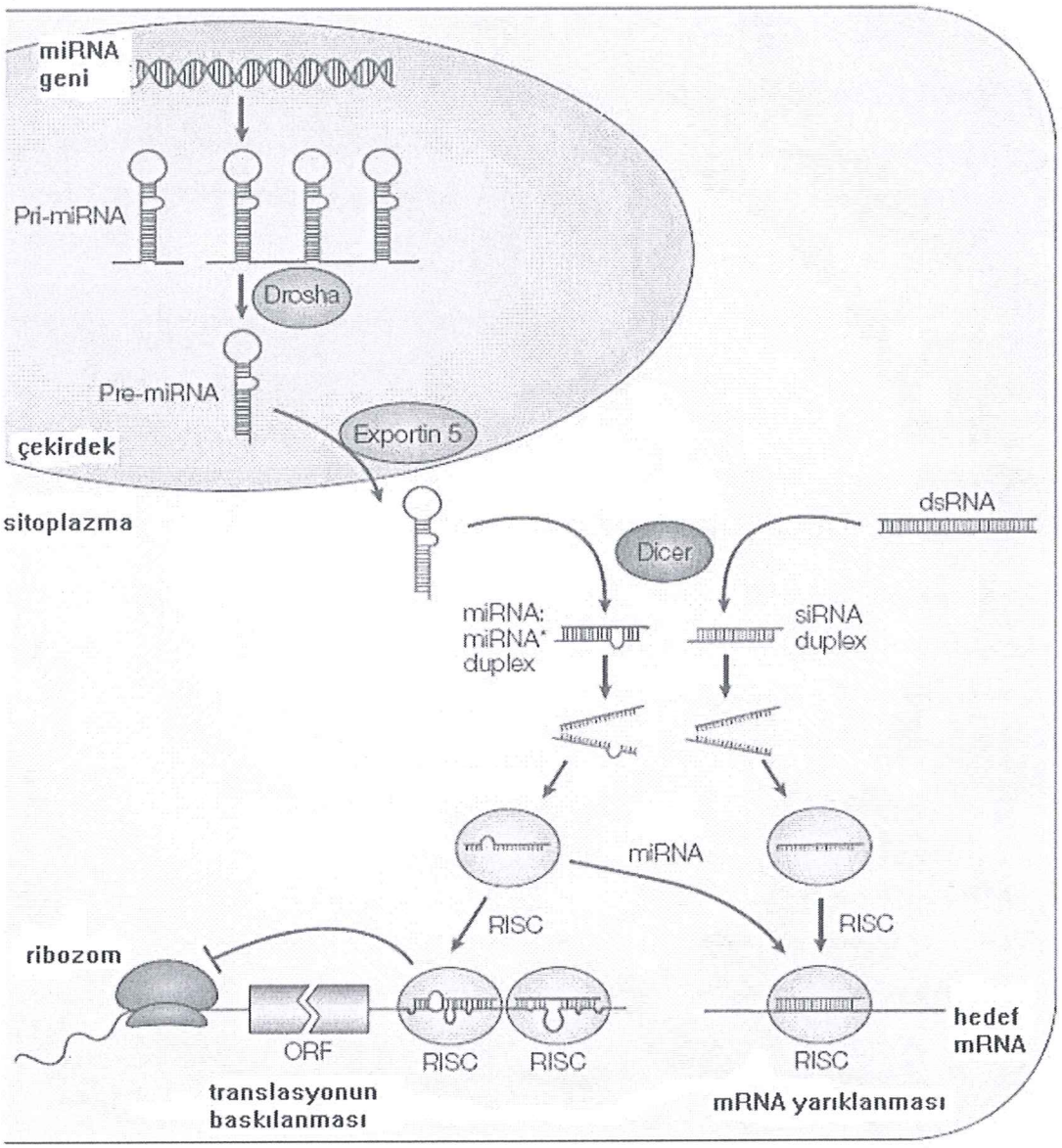
miRNA'lar, birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda meydana gelir. İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (68).

miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), "cap'' ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır (Şekil 2.2). Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (veya DGCR8), tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür (69). Bir nükleaz olan Drosha ile çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci kompleks (Microprocessor complex) adı verilir (70).



Şekil 2.1. Genomik yerleşimlerine göre miRNA'ların sınıflandırılması (66)

Pre-miRNA molekülü bir nüklear taşıma reseptörü olan Exportin 5 ve nüklear bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (71). Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA; miRNA dubleksine çevrilir (72). Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. Dicer, pre-miRNA'nın sap-ilmiğini kestikten sonra, miRNA: miRNA dubleksinden sadece biri RISC kompleksine dahil olur. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNAz olan argonaute'un etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya argonauteproteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (73).



Şekil 2.2. miRNA'nın işlenmesi (74)

2.2.3.4. MiRNA'ların Fonksiyonu

Olgun miRNA'lar hedef genlerin ifadesini azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. MiRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplimenter hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. MiRNA, RISC ile kompleks oluşturur, baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır, sonrasında protein translasyonunun inhibisyonuna ve/veya mRNA'nın yıkımına neden olur (75). MiRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (untranslated region-UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanır (Şekil 2.2).

Bağlanma pozisyonu miRNA kompleksinin mRNA'ya nasıl komplementer olduğuna bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ihtiva eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (76). Ayrıca, miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ifadesini düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (77).

2.2.3.5. miRNA; Translasyonel Gen İfadesini Düzenler

miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3′-UTR'ne bağlanmak suretiyle eşleşmenin derecesine göre protein kodlayan genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesine aracılık eder ve protein üretimini azaltıcı yönde gen düzenlemesine katkıda bulunur (78). Bu düzenlemede önemli bir adım olan translasyonun baskılanma biçimi miRNA kılavuz zinciri ve hedef mRNA arasındaki dizi eşleşmesinin derecesine bağlıdır. Bir miRNA'nın 2-8 nükleotidlik çekirdek dizisi, eğer translasyonun baskılanması için hedef aldığı mRNA söz konusu ise hemen her zaman mükemmel eşleşir. Kılavuz zincir ve mRNA arasındaki eşleşme ne kadar mükemmel olursa mRNA'nın enzimatik kesimi de kolaylaşır. Enzimatik kesim sadece AGO2'yi yapısında bulunduran RISC kompleksi ile gerçekleşir. AGO2 kesme işlevini kılavuz zincirin ilk bazına göre 10 ve 11. bazları arasından hedef zincirin fosfodiester omurgasını keserek gerçekleştirir (79).

Hedef aldığı mRNA ile mükemmel eşleşen miRNA, genellikle hedef mRNA'nın parçalanmasına neden olacak farklı mekanizmalarla translasyonu baskılar. Hücresel mRNA: miRNA parçalanma bölgesi olarak ise sitoplazma yerleşimli işlemci cisim, mültiveziküler cisim, ekzozomlar gibi aynı zamanda baskılanan mRNA'ların da toplandıkları yerler gösterilmektedir. İşlemci cisimler cap yapısını kaldıran enzimler olarak bilinen DCP1 (decapping 1) ve DCP2 (decapping 2), RNA helikazlar (RCK/p54), deadenilazlar (Ccr4:Not1 kompleks), ve RNazlar (Xrn1) içerirler. İşlemci cisimler, miRNA'nın katıldığı translasyonel baskılamanın son noktasıdır (79).

miRNA'nın translasyonel baskılamayı nasıl başardığını açıklamak için çeşitli mekanizmalar vardır. Translasyonel baskılama; translasyonun başlangıç ve uzama

adımlarında olabileceği gibi transkripsiyon sonrası polipeptid parçalanmasının kolaylaştırılması ve bunların geçici veya devamlı olarak çalışması ile de oluşur (79). Yapılan in vitro çalışmalarda miRNA let-7'nin mRNA'nın 5'cap yapısının tanınmasını inhibe ederek translasyonun başlamasını engellendiği bulunmuştur (80). 5'cap yapısının tanınmasındaki hata mRNA'nın parçalanması ile sonuçlanmaktadır. Diğer bir çalışmada ise başlama kodonuna toplanacak olan 60S'lik ribozom alt biriminin inhibe edilmesi (ribosom dropp out) ve uygun ribozom toplanmasına izin verilmeyerek miRNA'nın uyardığı miRISC oluşumunun engellendiği gösterilmiştir. Örneğin; mRNA transkriptlerinin poli A kuyruğu NIH3T3 (fare embriyonik fibroblast hücreleri) ve HeLa (hücrelerinde miRNA'nın baskılaması için gereklidir. Bu çalışmalar poli A kuyruğunun miRNA'nın aracılık ettiği ve poli A kuyruğu ile 5'm7G cap'e bağlanan proteinlerin etkileşimi ile gerçekleşen gen susturma mekanizmasında önemli role sahip olduğu bulunmuştur (81). Bunun yanında başka bir çalışmada ise miRNA'nın katıldığı gen susturulmasında poli-A kuyruğuna ihtiyaç olmadığı gösterilmiştir (82). Deneysel olarak gerçekleştirilen translasyonel baskılama mekanizmasında 2 olasılık vardır. Birinci olasılık, translasyonu sonlandıran kodon çıkarıldığı zaman kodlanan bölgenin sonunun okunmadan geçilmesine izin verilir ve miRNA'nın aracılık ettiği translasyonel baskılama gerçekleşmez. İkinci olasılık; miRNA'lar, zamanından önce olgunlaşmaya başlayan polipeptidin işlenmesine katılan uzama ve yeni nükleotidlerin eklenmesi gibi olayları inhibe eder (82).

Tek bir miRNA pek çok mRNA'ı hedef alarak bağlanma özelliğine ve proteinlerin yüzlercesinin üretimini azaltacak etkiye sahiptir. Öyle ki bir tek mRNA'nın 3'-UTR'i pek çok farklı miRNA tarafından hedef alınabilir. Sonuç olarak tüm miRNA sistemi (microRNAome); hücresel gelişim, farklılaşma, apoptozis ve metabolizma için gerekli protein kodlayan genlerin % 60'dan fazlasını düzenler. Beyinde bulunan miRNA'ların görevini yerine getirememesi veya normal olmayan ifadeleri Alzheimer hastalığı ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif bozukluklara neden olabilmektedir (83).

miRNA ifade profillerinin ortaya konulmasında çeşitli moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bu tekniklerden bazıları; küçük RNA klonlama, dizi analizi, miRNA microarray'leri ve Real-Time PCR'dır. Real-Time PCR yaygın kullanılan bir tekniktir. Kök-halka yapısında primerler kullanılarak geleneksel primerlere göre

daha özgün sonuçlar elde edilen bir yöntemdir. İdeal miRNA metodu için çeşitli şartların yerine getirilmesi gerekmektedir (84).

1- Başlama materyali küçük miktarlarda olsa bile miRNA profilini tanımlamak için yeterli duyarlılıkta olmalıdır,

2- miRNA'lar arasındaki 2 nt'lik farkı tanımlayabilecek güçte olmalıdır,

3- miRNA düzeylerinin kantitatif analizine izin vermelidir,

4- Çok sayıda örnek birarada çalışılabilmelidir,

5- Hazırlaması kolay olmalı ve standart moleküler biyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla bulunabilecek ekipman ve kimyasallarla çalışılabilmelidir.

miRNA'ların tespiti için pek çok geliştirilmiş kimyasal yöntem vardır. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı floresans etiketleme yöntemi olarak adlandırılan TaqMan Real-Time PCR yöntemidir (84).

2.3. MikroRNA Kanser İlişkisi

Protein kodlayan onkogen ve/veya tümör baskılayıcı genlerdeki değişimlerin kansere neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, tümör oluşumunda miRNA'ların da etkili olduğunun gösterilmesi ile kanserin genetik nedenlerinin anlaşılması daha da karmaşık bir hal almıştır (85). Kanserle ilişkilendirilmiş genomik alanlar ya da frajil bölgelerin %50.sinden fazlasının miRNA'yı kodlayan genlerden oluşması miRNA'ların kanser patojenezinde önemli olduğunu ortaya koymuştur (86). miRNA'ların hücre büyümesi ve apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde rol aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (87, 88). miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceğinin düşünülmesi ile birlikte, farklı kanser türlerinde farklı hücre tiplerinde miRNA'ların ifade olam seviyelerindeki değişimler incelenmiş, miRNA'ların normal ve patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği saptanmıştır. (89,90). miRNA'ların kanser hücrelerinin farklılaşmasında, tümör progresyonu ve metastazında rol oynadığı gösterilmiştir (91). miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışma Calin ve ark. (92) tarafından yapılmıştır. KLL hastaları ile yapılan bu çalışmada, hastaların yarısından fazlasında görülen 13q14 delesyonundan miR-15 ve miR- 16 genlerinin sorumlu olabileceğini göstermişlerdir.

Yapılan farklı bir çalışmada ise BCL2 antiapoptotik geninin iki farklı miRNA tarafından düzenlendiği ve BCL2 geninin ifadesinde artış olduğu ve tedavide kullanılabileceği bildirilmiştir. (93)

Agresif tümörler ve normal dokuların miRNA ifade seviyelerindeki farklılık Michael ve ark. (94) tarafından çalışılmıştır. Meme kanserinde (95), Burkitt.s lenfomada (96), malign beyin tümörlerinde (97), tiroid kanserinde (98), akciğer kanserinde (99), prostat kanserinde (100), mesane kanserinde ve kolon kanserinde miRNA seviyelerinde değişiklikler (101) olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. 283 miRNA'nın mesane, prostat ve kolon kanserlerinde genomik DNA'daki kopya sayısı değişimi araştırılmış, prostat ve kolon kanserlerinde kopya sayısının arttığı bölgelerde miRNA'ların yüksek oranda bulunduğu, kopya sayısının azaldığı bölgelerde ise az olduğu saptanmıştır. Mesane kanserinde ise kopya sayısı ile miRNA seviyesi arasında ters bir ilişki olduğu belirlemiştir (101). Takamizawa ve ark. (102) akciğer kanseri ile ilgili in vitro ve in vivo çalışmalarında, let-7 ifadesinin azalmış olduğunu bildirmişlerdir. Ras ve myc onkogenlerinin, p53 tümör baskılayıcı gen ile birlikte, akciğer kanserinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Akciğer tümör dokusunda, normal akciğer dokusuna göre, let-7 seviyesinde belirgin miktarda azalma olurken Ras protein miktarında ise dikkat çekici bir artış olduğu saptanmıştır. Ras'ın let-7 ile düzenlenmesinin akciğer onkogenezinde bir mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir (103). Let-7.nin tersine miR-17-92 ifadesi, akciğer kanserlerinin en agresif şekli olan küçük hücreli akciğer kanserinde artış göstermektedir (100). Çalışmalarda miR-17-92 gen kümesi ile küçük hücreli akciğer kanserlerinde aşırı miktarda sentezlendiği bilinen c-myc onkogeni arasında bir bağıntı olduğu ortaya konmuştur (104). let-7'nin meme kanserinde etkili olduğu ve artan let-7 miktarının meme dokusunda, kanserli hücrelerin artışını yavaşlattığı görülmüştür (105). MikroRNA ifadelerinin normal ve neoplastik meme dokusu arasındaki farklılık, özellikle miR-125b, miR145, miR-21 ve miR-155 miRNA'larının ifadelerinin meme kanseri dokusunda oldukça azaldığı saptanmıştır (106). Ayrıca normal ve kanserli meme dokusu arasında görülen miRNA ifade düzeyi farklılıklarının tümör seviyesi, çoğalma miktarı, östrojen ve progesteron reseptörü ifadesi ve vasküler invazyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir. (97). Lars ve ark. 11 normal ürotelyumda ve 106 mesane tümörü 290 miRNA'nın ifadesini karşılaştırmış, miR-145, miR-143, miR-125b'nin ifadesi azalırken; miR-21 ifadesinin arttığını bulmuşlardır. Kanser

dokusunda ifadesi en çok azalan miR-145, en çok artan miR-21 olduğu saptanmıştır (107). James ve ark. (108) 52 ürotelyal karsinom, 6 ürotelyal karsinom hücre serisi ve 20 normal ürotelyumla 322 miRNA'nın ifadesini RT-PCR yöntemiyle analiz etmişlerdir. miR-133b, miR-125b, miR-143, miR-100, miR-99a ve miR-204'ün düşük dereceli ürotelyal karsinoma göre normal ürotelyumda fazla eksprese olduğunu saptamışlardır. miRNA ifade değişimlerinin tümör progresyonunu tahmin etmede kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Chen ve ark. (109) miR-143'ün K-Ras onkogeninin translasyonunu kolorektal kanser hücrelerinde inhibe ettiğini saptamıştır. Akao ve ark. (110), 63 kolorektal kanser, 65 adenoma dokusu ve tümör içermeyen komşu dokularda miRNA profilini incelemiş, miR-143 ve mir-145'in ifadelerinin kanser ve adenoma dokularında azaldığını tespit etmişlerdir. Bu azalmanın tümörogenezin erken safhalarında olduğunu ve miR-143 kullanılarak yapılan RNA bazlı tedavinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği belirtmişlerdir (110). BMPR1B geninde miR-125b'nin bağlandığı bölgedeki polimorfizm meme kanseri riskini arttırmaktadır. (111), Lösemilerde miR-125b geni ifadesini arttığından miR-125b onkogenik özelliktedir. (112).

Kanserde herhangi bir genin tek başına incelenmesi yerine, gen ifadesinin genel analizi, tanı açısından oldukça önemlidir. DNA mikrodizinlerinin kullanımı, on binlerce genin aynı anda incelenmesine olanak sağlar. Farklı tümörlerin gen ifade profilleri kıyaslanarak, moleküler bir sınıflama yöntemi geliştirilmesiyle, gen ifade profillerinin, başka özellikleri bakımından benzerlik gösteren tümörleri birbirinden ayırabilmede kullanılabileceği ve hastalığın klinik seyri ya da tedaviye cevabı açısından bilgi verebileceği saptanmıştır. Son zamanlarda kanser çalışmalarında miRNA'ların ifade düzeyleri normal hücrenin miRNA'sı ile karşılaştırılarak yeni bir yaklaşım oluşturulmuştur(113, 114).

Tablo 2.1:Hematolojik kanserlerde görülen onkogenik(OG) ve tümör baskılayıcı (OS)genler

MikroRNA	Kanserler	Fonksiyon	Hedef Gen
miR-17-92	Lenfoma	OG	*E2Fs, PTEN, BIM, PHLP2*
	T-ALL	OG	*PTEN, BIM*
	AML	OG	*EGR2, BIM, P21*
miR-26	Lenfoma	OS	*EZH2*
	T-ALL	OS	*E2F7*
	AML	OG	*PTEN*

	Lenfoma	OS	CDK6
miR-29	AML	OS	*DNMT3A, DNMT3B, SP1, MCL1*
	B-KLL	OS/OG	*HBP1, TCL1, PXDN*
miR-34	AML	OS	*CREB, E2F3*
	KLL	OS	*TCL1, SIRT1*
miR-125	AML ve ALL	OG	*CBFB, ABTB1, BAK1, PTPN18, PTPN7, PP1CA, PP2CA, LIN28*
miR-146	MDS	OS	TRAF6
	Lenfoma ve	OG	*SHIP, CEBPβ, HDAC4, BCL6*
miR-155	ALL	OG	*BACH1, SLA, CUTL1, CSF1R, JARID2, CEBPβ, PU.1, ARNT1, HIF1A, PICALM*
	AML		
	AML	OS	*E2F1, NFI-A*
miR-223	T-ALL	OG	*FBXW7*
miR-328	KML	OS	*PIM1*

2.3.1. Tümör Baskılayıcı MiRNA'lar

MiRNA'ların kanserleşme sürecine etkisi ilk olarak 2001 yılında miR-15a ve miR16-1'in keşfedilmesi ile rapor edilmiş (115) olup, bu miRNA'ların etki mekanizması ise 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışma ile ortaya konmuştur (116). Bu iki miRNA'nın ifade seviyelerinin KLL (Kronik Lenfositik Lösemi) hücrelerinde, anti-apoptotik B hücreli lenfoma proteini olan Bcl-2'nin üretimi ile ters ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle Cimmino ve arkadaşları miR-15a ve miR16-1'in tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Bu iki miRNA'nın düşük seviyelerinin (tümör baskılayıcı fonksiyon kaybı) Bcl-2 protein miktarının artışı ile ilişkili olduğu dolayısıyla anormal hücre büyümesinin apoptozun engellenmesi sonucunda olduğu ortaya konmuştur (116). Normal seviyelerinin kontrolsüz hücre büyümesini engellediği rapor edilen miR-15a ve miR16-1'in böylelikle tümör baskılayıcı aktiviteleri belirlenmiş oldu.

Tümör baskılayıcı özellik gösteren diğer bir miRNA, let-7 ailesinin üyeleridir (let-7b, let-7c, let-7d, let-7f ve let-7g). Akciğer kanserli hastaların akciğer dokusu, normal akciğer dokusu ile karşılaştırıldığında çoğunlukla düşük let-7 seviyeleri gözlenmiştir (117). Bir akciğer kanseri hücre kültürü modelindeki let-7 seviyeleri,

normal hastaların akciğer dokusundaki let-7 seviyelerinden daha yukarılara çıkarıldığı zaman, kanser hücrelerinin büyümesinin önemli derece düştüğü rapor edilmiştir (117).

Johnson ve arkadaşları, 2005 yılında let-7'nin insanlarda bulunan önemli bir onkogen olan Ras'ın aktivitesini kontrol ettiğini buldular (103). Yapılan bu çalışmada, düşük seviyelerde let-7 ihtiva eden akciğer tümör dokuları, önemli derecede artmış Ras protein seviyelerine sahip olduğu saptanmıştır (118). Sonuç olarak let-7 ailesi üyelerinin, RAS onkogenin mRNA'sını hedefleyen bir tümör baskılayıcı fonksiyona sahip olduğu tespit edilmiş oldu. Yapılan son çalışmalarda, let-7 miRNA ailesi üyelerinin çok iyi tanımlanmış onkogenler olan HMGA230 ve c-Myc31'in mRNA'larını da inhibe ettikleri bulundu (118).

İzoformu üç tane olan miR-29 (miR-29a, miR-29b, miR-29c), tümör baskılayıcı karakter sergileyen miRNA'lar arasındadır. MiR-29 ailesinin üyelerinin kronik lenfositik lösemi (KLL) (119), akciğer kanseri (120), invaziv meme kanseri (121), akut miyleoid lösemi (AML) (122) ve kolanjiyokarsinom (123) hücrelerini baskılayıcı olarak aktivite gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur.

MiRNA-143'ün tümör türlerinde, anormal büyümeyi baskıladığı bilinmektedir. B-hücreli kanserler (124), meme, serviks (125), kolorektal (126), mesane (127) ve hipofiz tümörlerinde (128), miR-143'ün tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı rapor edilmiştir. Serviks kanserinde miR-143'ün hücre proliferasyonunu baskıladığı, kolorektal kanser hücrelerinde ise K-Ras (viral onkogen) ve K-Ras yolağını doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir (129).

2.3.2. Onkogenik MiRNA'lar

Tümör baskılayıcı miRNA'ların tersine, onkogenik miRNA'lar çoğunlukla kanser türlerinde kontrolsüz büyümeyi arttırıcı ve/veya anti-apoptotik yönde fonksiyon gösterirler. İlk olarak keşfedilen onkogenik miRNA'lardan bir tanesi, protein kodlamayan gen olan BIC (B cell İntegration Cluster) ile beraber ifade olan miR-155'tir. Mir-155'in hedef mRNA'sı tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, ifadesinin tavukta lösemi ve lenfoma oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (130). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miR-155'in B hücreli lenfoma (131), meme ,

pankreas (132), akciğer (121) ve Hodgink's lenfoma (133) gibi kanserlerde ifadesinin arttığı gösterilmiştir.

Onkogen gibi fonksiyon gösterdiği tespit edilen diğer bir miRNA, miR-21'dir. MiR-21'in AML, KLL ve glioblastoma (134) gibi hematolojik kanserlerde ve pankreas, prostat, mide, kolon, akciğer, meme (135) ve karaciğer kanseri (136) gibi birçok kanser türünde ifadesinde artış olduğu gözlenmiştir. MiR-21, transkripsiyonel olarak Stat3 tarafından IL-6 sinyal yolağında aktif duruma geçmektedir (137). MiR-21, invazyon ve metastaz olaylarında çok iyi karakterize edilmiştir. MiR-21, hücre hareketini ve invazyonu, tümör baskılayıcı bir protein olan PTEN'in mRNA'sını hedefleyerek teşvik etmektedir. PTEN, birkaç MMP(Matriks Metalloproteaz)'nin ifadesini engelleyerek dolayısıyla hücre invazyonunu azaltarak tümör baskılayıcı bir etki göstermektedir (136). Son zamanlarda, kolorektal kanserlerde MiR-21'in, PDCD4'ü baskıladığı, bunun da invazyon ve metastaza yol açtığı belirlenmiştir (138).

MiR-17-92 gen kümesi, insan genomunda kromozomun 13q31.3 yerleşiktir. Bu gen kümesi altı adet miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1) kodlamaktadır. miR-17-92 gen kümesi, onkogenik etkili olduğu gösterilen ilk miRNA'dır. c-Myc onkogeninin ifadesinde artış olan transgenik farelerde miR-17-92 gen kümesinin üyelerinin de ifadelerinde artış olduğu B hücreli lenfomada gösterilmiştir (139). Bu gen kümesinin, akciğer gelişiminde, bağışıklık ve hematopoeitik sitemin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir bölge olmasına bağlı olarak, hematolojik kanserlerde, meme, kolon, akciğer, pankreas, prostat, mide ve lenfomaları da içine alan kanser türlerinde miR-17-92 üyelerinin ifadesinde artış olduğu belirlenmiştir (140). Bu miRNA'lar ifade artışı ile proliferasyonu teşvik ederek, apoptoz inhibisyonunu sağlayarak ve tümör anjiyogenezi tetikleyerek kanser gelişimine katkıda bulunmaktadır. MiR-17-92 gen kümesinin kanser gelişimine katkısının iki mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlardan bir tanesi birkaç lenfoma ve kanser türünde görülen 13q31 lokusunun amplifikasyonu, diğer mekanizma ise miR-17-92 gen kümesinden kodlanan pri-miRNA'nın transkripsiyonel aktivasyonudur. Onkogenik transkripsiyon faktörü olan c-Myc, miR-17-92 gen kümesinin kontrol bölgesine bağlanarak bu genin ifadesini aktive etmektedir (141). Ayrıca E2F ailesinin üyelerinin (E2F1,2 ve 3) de miR-17-92 gen

kümesini aktive ettiği gösterilmiştir. E2F1,2 ve 3 bu gen kümesinin aktivasyonunu sağlamakla birlikte, bu kümedeki miR-17 ve miR-20a tarafından gerçekleşen baskılamanın hedefi durumundadır (142).

2.4. MiRNA'ların Aktivitelerinin Kanserdeki Bozulma Mekanizmaları

miRNA ifade düzeyinin değişmesi: Birçok kanser türünde miRNA'ların ifade düzeylerinin normal dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bazı miRNA'ların ifade düzeyleri artarken bazılarınınki azalmıştır. Bu ifade değişimini açıklamak için birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bu mekanizmalar; miRNA'ların promotor bölgelerindeki metilasyon, miRNA'lardaki mutasyonlar, miRNA işlenmesinin değişmesi olabilmektedir (143).

miRNA işlenmesinin değişmesi: miRNA işlenmesinde görev alan Drosha ve RISC yapısının oluşmasında yer alan Argonate ailesi üyesi proteinleri etkileyen mutasyon veya ifade değişimleri de olgun miRNA oluşmasını ve RISC yapısının görevini yerine getirmesini engeller. Bu nedenle bazı kanser türlerinde bu proteinlerin ifade düzeyleri ve kodlayan genlerin mutasyonlarının da moleküler patogenezde rol oynadığı gösterilmiştir (144,145).

mRNA eşleşmesini sağlayan dizilerde mutasyonlar: Bu mutasyonlar miRNA'lardaki mutasyonlar ve mRNA'nın 3'UTR bölgesindeki mutasyonlar olarak iki gruba ayrılabilir. mRNA'nın 3' UTR kısmındaki mutasyonlar i) miRNA'nın bağlanmasını azaltabilir veya arttırabilir ii) miRNAlar için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir (146).

2.5. MiRNA'larda Mutasyonlar

Birçok kanser türünde kansere yakalanan bireyler için aile öyküsü bulunduğu halde, bu durumdan sorumlu kalıtsal mutasyonları taşıyan genler sadece belli kanserler için tanımlanabilmiştir. miRNA'ların kanserde oynadıkları rol göz önünde bulundurulduğunda bu miRNAları kodlayan genlerdeki mutasyonların da protein kodlayan genlerde olduğu gibi ailesel kanserlerde yatkınlık etkisi veya kanser oluşumunda etkisi olabileceği düşünülebilir. Bu mutasyonlar;

i) olgun miRNA'nın yapısını değiştirerek hedef transkripti ile eşleşmesini değiştirebilir

ii) primRNA veya premiRNA'daki mutasyonlar miRNA'nın işlenmesini etkileyebilir

iii) pri-miRNA'nın promotor bölgesindeki mutasyonlar transkripsiyonu değiştirebilir (146).

KLL ile ilgili yapılan çalışmada miRNA genlerinde %15 somatik mutasyon saptanması ve pri-miR-16-1/15a'da germ-line bir mutasyon bulunması miRNA'ların da bu açıdan incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (143). Ayrıca bir miRNA'nın birçok genin transkriptini hedefliyor olması, küçük bir değişikliğin dahi kanser transformasyonda önemli sonuçları olacağını düşündürmektedir (147).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'nda hematolojik kanserlerden 6 adet Non-Hodgkin Lenfoma (NHL), 2 adet Hodgkin Lenfoma ,12 adet AML ve 4 adet ALL tanısı konmuş, takip ve tedavisi yapılan toplam 24 gönüllü hasta ve akrabalık ilişkisi olmayan 33 gönüllü sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hematolojik kanser çalışma hastalarının yaş, cinsiyet ve tanı bilgileri Tablo 3. 1' de verilmiştir.

Gazintep Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurul'unun toplantısında, tez çalışması için 20.09.2012//334 numaralı Etik Kurul onayı alınmıştır.

Tablo 3.1.Hematolojik kanser hastalarının yaş,cinsiyet ve tanısı

Birey Numarası	Yaş	Cinsiyet	Tanı
1	26	E	Non-Hodgkin Lenfoma(T HC'Lİ)
2	54	E	Akut Myelositer Lösemi
3	56	E	Non-Hodgkin Lenfoma(DLCL)
4	27	E	Akut Myelositer Lösemi
5	50	K	Akut Myelositer Lösemi
6	44	K	Akut Myelositer Lösemi
7	52	E	NHL (MANTLE CELL)
8	50	K	Akut Myelositer Lösemi
9	25	E	Akut Lenfoblastik Lösemi
10	58	K	Akut Myelositer Lösemi
11	48	E	Akut Myelositer Lösemi
12	19	K	Akut Lenfoblastik Lösemi
13	78	K	Non-Hodgkin Lenfoma(DLCL)
14	40	K	Hodgkin Lenfoma
15	56	E	Hodgkin Lenfoma
16	65	E	Akut Myelositer Lösemi
17	20	E	Akut Lenfoblastik Lösemi
18	26	E	Akut Myelositer Lösemi
19	39	E	Non-Hodgkin Lenfoma(DLCL)
20	64	K	Akut Myelositer Lösemi
21	43	E	Akut Myelositer Lösemi
22	64	E	Akut Myelositer Lösemi
23	43	K	Akut Lenfoblastik Lösemi
24	34	E	Non-Hodgkin Lenfoma(DLCL)

3.2.Örneklerin Kodlanması

Çalışma kapsamında, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı'nda hematolojik kanserler tanısı konmuş 24 gönüllü hastadan tedavi öncesinde ve tedavi aldıktan sonraki dönemlere ait periferal kan örnekleri ile 33 gönüllü sağlıklı kontrol, olmak üzere toplam 81 kan örneği toplanmıştır. Kandan RNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar örnekler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuarında -80 ^{o}C'de saklanmıştır. Kan örnekleri tedavi öncesi hasta grubu, tedavi sonrası hasta grubu ve kontrol grubu olmak üzere üç grup olarak analiz edilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo3.2: Tedavi öncesi(TÖ) , tedavi sonrası (TS) hasta gruplarının ve kontrol grubunun(K) kodlanması

Gruplar	Örnekler
Tedavi Öncesi Hasta Grubu	TÖ1, TÖ2, TÖ3, TÖ4, TÖ5, TÖ6, TÖ7, TÖ8, TÖ9, TÖ10, TÖ11, TÖ12, TÖ13, TÖ14, TÖ15, TÖ16, TÖ17, TÖ18, TÖ19, TÖ20, TÖ21, TÖ22, TÖ23, TÖ24
Tedavi Sonrası Hasta Grubu	TS1, TS2, TS3, TS4, TS5, TS6, TS7, TS8, TS9, TS10, TS11, TS12, TS13, TS14, TS15, TS16, TS17, TS18, TS19, TS20, TS21, TS22, TS23, TS24
Kontrol	K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12, K13, K14, K15, K16, K17, K18, K19, K20, K21, K22, K23, K24, K25, K26, K27, K28, K29, K30, K31, K32, K33

3.3. Gereçler

3.3.1.Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışma boyunca kullanılan araç-gereç, kimyasal ve saf malzemeler aşağıda sıralanmıştır.

1. Kullanılan Araçlar-Gereçler

- Santrifüj (Hettich Mikro 200R)
- Derin Dondurucu (Arçelik 2031D)
- Real-Time PCR (ECO Real Time System, Illumina)
- PCR (Biorad T100)
- Vorteks (Biosan)
- Mikropipet Seti (Brand)
- Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- Buzdolabı (Arçelik 8188 NF)
- NanoDrop 2000C

2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

- MO BIO BiOstic® Blood Total RNA Isolation Kit (MoBio- 12230-50)
- Poly-A Tailing Kit (Ambion- AM1350)
- Genedirex Taq Polymerase ve 10X Reaksiyon Tamponu (100 ul) (Genedirex-MB101-0500)
- EvaGreen miRNA qPCR Mastermix-low ROX (4x1.25 ml) (Abm-Mastermix-mL)
- Steril Apirojen Distile Su (Bioshop)
- Abm miRNA cDNA Synthesis Kit (100 rxn) (Abm, G269)
- Etanol (Riedel-de Haen 32221)
- Polipropilen Real Time PCR Plate (48'lik) (Illumina)
- ECO Real Time PCR Plate kaplama Filmi (100'lük) (Illumina)
- Pipet ucu 200µl'lik (Starlab, S1111-0006)
- Pipet ucu 10µl'lik (Starlab, S1110-3000)

- Pipet ucu 1000 µl'lik (Starlab, S1605-0001)
- Mikrosantrifüj tüpü 1.5 µl'lik (Starlab, S1605-5500)
- Mikrosantrifüj tüpü 0.5 µl'lik (Starlab, S1605-0000)

3.4. Kandan RNA Eldesi

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'nde hematolojik kanserlerden akut myelositer lösemi, akut ve kronik lenfoblastik lösemi, Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma tanısı alan gönüllü 24 bireyden tedavi öncesi ve sonrasında, kontrol grubu içinse gönüllü 33 sağlıklı bireyden 5 ml periferal kan alınarak EDTA'lı tüplerde -80 °C'de korundu. 24 hasta bireyin tedavisinin tamamlamasının ardından -80 °C'de saklanan kanlardan RNA izolasyonu Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuarında gerçekleştirildi. Total kandan RNA izolasyonu "MO BIO BiOstic® Blood Total RNA Isolation Kit" kullanılarak yapıldı. Kit protokolüne bağlı kalınarak öncelikle eritrositler sonrasında ise lökositler parçalandı. RNA kolonda toplandıktan sonra DNaz uygulaması ve yıkama aşamalarından sonra elüsyon gerçekleştirildi. Kit protokolü aşağıdaki gibidir:

500 µl kan, 15 ml toplama tüpüne alındı üzerine 2.5 ml BR1 solüsyonu eklendi ve 4 dakika vortekslendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi, inkübasyon sırasında en az üç kez alt üst edildi. Beyaz kan hücrelerini pellet haline getirmek için 2000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra tüp temiz emici bir kağıt üzerine en az bir dakika ters çevrildi. RBC lizatının mümkün olduğu kadar absorbe edilmesi için tüpe bir kaç kez vuruldu. Hücre pelletine 300 µl βME içeren BR2 solüsyonu eklenir ve yüksek hızda 1-2 dakika tamamen homojen hale gelene kadar çalkalandı (bu basamak genomik DNA kontaminasyonunu azalttı). Homojenize edilen örneğe 300 µl BR3 Solüsyonu eklendi ve pipetle iyice karıştırıldı. Herhangi bir çökelti içermeyen 650 µl örnek spin filtre kolonuna transfer edildi ve 10,000 x g'de 30 saniye santrifüj edildi. Toplanan sıvı atıldı ve spin filtre 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Spin filtreye 400 µl BR4 solüsyonu eklendi. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplanan sıvı atıldı ve 2 ml'lik aynı toplama tüpüne alındı ve ek olarak 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi (bu basamak DNaz uygulaması öncesi

BR4 solüsyonunun tamamen atılmasını sağladı). Spin filtre 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne transfer edildi. Spin filtrenin ortasına 50 µl DNAaz 1 solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Spin filtrenin merkezine 400 µl BR4 solüsyonu eklendi ve 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplanan sıvı atıldı ve spin filtre 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Spin filtrenin merkezine 500 µl BR6 solüsyonu eklendi ve 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplanan sıvı atıldı ve spin filtre tekrar 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. Spin filtreye 500 µl BR6 solüsyonu eklenerek yıkama tekrar edildi. 10,000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplanan sıvı atıldı ve spin filtre tekrar 2 ml'lik toplama tüpüne alındı. 10,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve membranın tamamen kuruması sağlandı. Spin filtre tekrar yeni 2 ml'lik toplama tüpüne transfer edildi ve 50 µl BR7 solüsyonu (steril su) eklendi. 1 dakika inkübe edildi ve 10,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Spin filtre alındı ve 2 ml'lik toplama tüpü kapatıldı. Elde edilen RNA örnekleri "NanoDrop 2000c" cihazı ile ölçüldü. RNA kullanıma hazır olarak -80°C'de saklandı.

-80°C'de saklanan RNA'lar ifade analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için kitin satın alındığı firma tarafından;"Illumina® Eco Real Time PCR" cihazının bulunduğu Done Genetik Laboratuarı'na yönlendirilmiş ve tezin sonraki tüm basamakları tez öğrencisi Halime Sabancı tarafından Done Genetik Laboratuarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.5. Poly-A Kuyruğu eklenmesi

RNA izolasyonun tamamlanmasının hemen ardından, tüm örneklerden 50 ng alınarak, toplam 20 µl hacimde poly-A kuyruğu eklendi. Bu aşamada "Ambion Poly-A Tailing Kit" kullanıldı. Poly-A kuyruğu eklenmesinde kullanılan bileşenler ve miktarları aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.3. Poly-A kuyruğu eklenmesinde kullanılan bileşenler ve miktarları.

İçerik	Miktar
Total RNA	50 ng (10 µl)
5X Poly A Buffer	4 µl
25mM $MnCl_2$	2 µl
5mM ATP	3 µl
Poly A Polymerase	1 µl

Karışım tamamlandıktan sonra 37°C' de 30 dakika bekletildi ve -20 °C' ye alındı.

3.6. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Dönüşümü

Poly-A kuyruğu eklenmesinin ardından cDNA reaksiyonları için "ABM miRNA EasyScript cDNA Synthesis Kit" kullanıldı. Tablo 3.4' da miktarları belirtilen solüsyon hazırlandı.

Tablo 3.4. cDNA reaksiyonları için hazırlanan solüsyon ve miktarı

İçerik	Miktar
Poly A Tailed RNA (50 ng)	10 µl
miRNA Oligo dT Adapter (10 µM)	2 µl

Hazırlanan karışım 65°C' de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnekler hemen buzun üzerine alındı, santrifüj edildi ve Tablo 3.5'te miktarları belirtilen karışım eklendi.

Tablo 3.5. cDNA sentezi için reaksiyon içeriği

İçerik	Miktar
dNTP(s) (10 mM)	1 µl
5x RT Buffer	4 µl
RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor (40 u/µl)	0,5 µl
EasyScript™ RTase (200 U/µl)	1 µl
RNase Free H_2O	1,5 µl

Karışımın eklenmesinin ardından vorteks ve kısa santrifüj yapıldı. 42°C' de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İlk inkübasyonunun tamamlanmasının ardından 70°C'de 10 dakika ikinci inkübasyona bırakıldı ve böylece cDNA sentez işlemi tamamlandı. Örnekler -20 °C' de saklandı.

3.6.1. Primer Listesi

Çalışmada housekeeping miRNA geni olarak "U6-2" geni içim primer çifti seçildi. Çalışma kapsamındaki genler ise sırasıyla miR17, miR18a, miR19a, miR19b, miR20a ve miR92a genleri için seçilmiş olan primer çiftleridir. miRNA primerleri ABMGood firmasından temin edilmiş olup kullanılan primer dizilerinin katalog numarası aşağıda Tablo 3.6 'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Kullanılan primerler ve katalog numaraları

Primer	**Katalog no**
U6-2 (housekeeping)	MPH00001
miR17	MPH01192
miR18a	MPH01208
miR19a	MPH01242
Primer	**Katalog no**

miR19b	MPH01243
miR20a	MPH01257
miR92a	MPH02020

3.7. qPCR Gen İfadesi

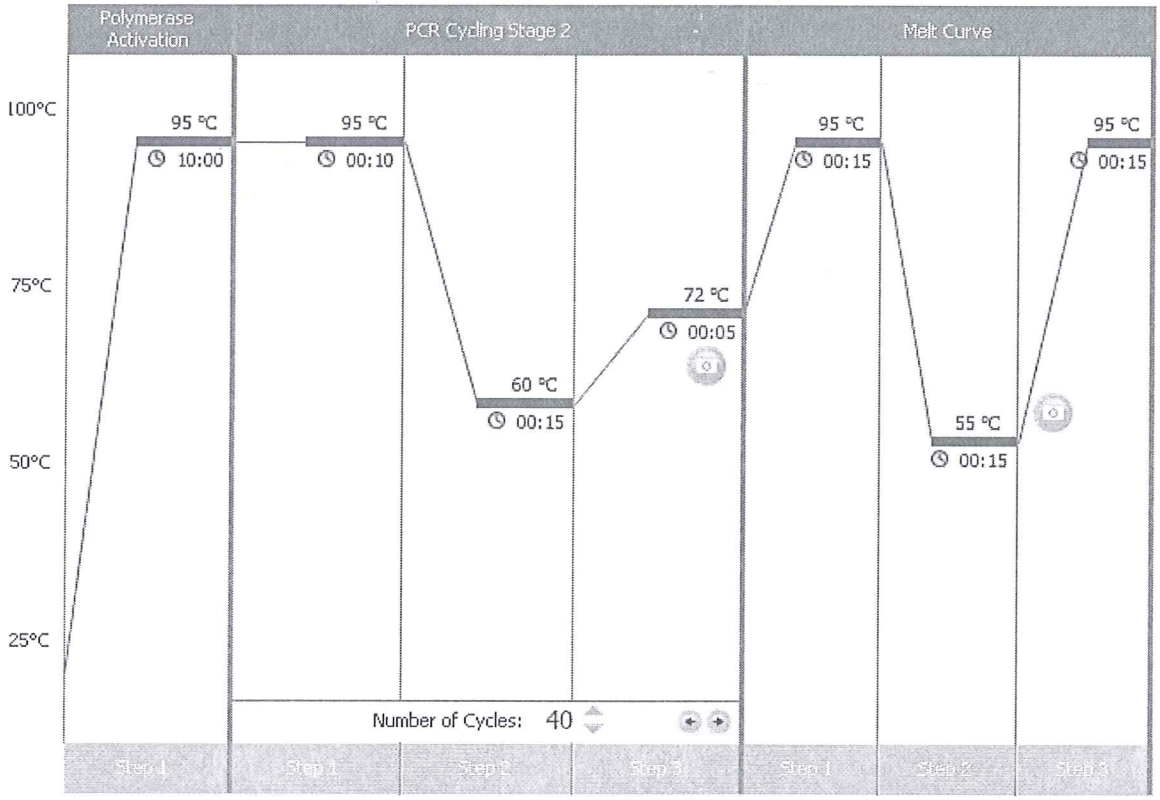
Toplam 81 örnekte, 7 primer çifti(U6-2, miR17, miR18a, miR19a, miR19b, miR20a ve miR92a ile miRNA) ifade seviyelerinin hesaplanması amacıyla U6-2 primer çifti housekeeping miRNA primeri seçilerek reaksiyonlar gerçekleştirildi. qPCR reaksiyon karışımı "ABM EvaGreen qPCR miRNA Mastermix Low-ROX" kiti kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan karışıma solüsyonlar aşağıda belirtilen miktarlarda eklendi.

Tablo 3.7. qPCR reaksiyonu için gerekli karışım ve miktarları

İçerik	**Miktar**
EvaGreen 2X qPCR Mastermix	10 µl
Primerler (10 µM)	0,4 µl
cDNA	1 µl
Nuclease-free dH_2O	8,2 µl

qPCR reaksiyonları "Illumina® Eco Real Time PCR" cihazı ile 48 örneklik platelerde gerçekleştirildi. qPCR reaksiyonu aşağıdaki gibi tamamlandı.

Şekil 3.1. qPCR reaksiyon koşulları



Estimated Program Length: 46 Minutes 21 Seconds

qPCR sonuçları "Illumina Eco Software" ve "Illumina Eco Study" programları ile ön analize tabi tutuldu.

3.8. İstatistiksel Analiz

Hastaların yeni tanı aldığı dönem ve tedavi sonrasındaki döneme ait miRNA ifade profilleri ile kontrol grubu ifade profillerinin karşılaştırılmasında ve tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların değerlerinin karşılaştırılmasında non-parametrik istatistiksel analiz yöntemleri (Willcoxen ve Mann Whitney U Testi) kullanıldı. p değeri 0,05'den küçük olanlar ($p < 0,05$) anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniğinde hematolojik kanserlerden akut myelositer lösemi, akut ve kronik lenfoblastik lösemi, Hodgkin ve Non-Hodgkin lenfoma tanısı alan gönüllü 24 bireyden 5 ml periferal kan alınarak EDTA'lı tüplerde -80 ^{o}C'de korundu. Kan örnekleri hastaların tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında ayrı ayrı alınarak tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) gruplar oluşturuldu. Yirmi dört hastanın 8'i kadın, 16'sı erkek olup, kontrol grubu ise 6 kadın, 27 erkek olmak üzere 33 gönüllü sağlıklı bireyden oluşmaktadır. Hasta grubunun yaş ortalaması 45.04±6.2, kontrol grubunun yaş ortalaması 34.18±6.3 olarak hesaplandı.

Araştırmanın moleküler analizleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi. Hastalara ait kan örneklerinden miRNA izolasyon kiti kullanılarak miRNA elde edildi. miRNA "Revers Transcription Kit "kullanılarak tersine polimeraz zincir reaksiyonu uygulandı. Son olarak hematolojik kanser türlerinde ifade profilleri değişiklik gösteren miRNA'ların ifade düzeylerinin saptanması hibridizasyon temelli mikrodizgi (microarray) yöntemi ile gerçekleştirildi. Araştırma kapsamında çalışılan miR-17-92 gen kümesi, hematolojik kanserlerin gelişiminde rolü olduğu bilinen önemli miRNA'lar kriter alınarak seçildi.

4.1. Grupların İfade Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Kantitasyon döngüsü (Cq) değerlerinin sonuçlarına göre elde edilen ortalama döngü sayıları her bir grup için ayrı ayrı hesaplanmıştır. MiR-17-92 gen kümesi üyelerinin tümü (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ve miR-92a) ve "housekeeping"(U6-2) gen için elde edilen verilerin hesaplamaları "ΔΔCq Metoduna" göre yapılmıştır. Buna göre her bir grup için kat değişim oranları hesaplanmıştır. Hematolojik kanserlerin gelişiminde rol aldığı bilinen miR-17-92 gen kümesi üyelerinin (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ve miR-92a) ifade düzeyleri aşağıda verilmiş olan gruplarda istatistiksel olarak analiz edildi.

1. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası gruplar ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldı,
2. Tedavi öncesi ve sonrası gruplar birbirleri ile karşılaştırıldı,

3. Tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki değerler tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında ayrı ayrı karşılaştırıldı.

Teknik nedenlerden dolayı tedavi öncesinde elde edilmiş olan kan örneklerinden miRNA eldesi yapılamayan örneklerimiz bulunmaktadır. Bu nedenle istatiksel analize alınan hasta sayıları tablolarda farklılık göstermektedir. Tedavi öncesi ve sonrasındaki hasta grupları kontrol ile karşılaştırılırken her bir miRNA için değerlendirilen hasta sayısı şöyledir; miR-17 geni için tedavi öncesi hasta grubunda 21 birey, tedavi sonrası hasta grubunda 24 birey, miR-18a geni için tedavi öncesi hasta grubunda 20 birey, tedavi sonrası hasta grubunda 24 birey, miR-19a geni için tedavi öncesi hasta grubunda 21 birey, tedavi sonrası hasta grubunda 24 birey, miR-19b geni için tedavi öncesi hasta grubunda 19 birey, tedavi sonrası hasta grubunda 24 birey, miR-20a geni için tedavi öncesi hasta grubunda 21 birey, tedavi sonrası hasta grubunda 24 birey, miR-92a geni için tedavi öncesi hasta grubunda 23 birey, tedavi sonrası hasta grubunda 24 birey değerlendirmeye alınmıştır. Tedavi öncesi ve sonrasındaki hasta grupları birbirleri ile karşılaştırılırken ve tedaviye yanıt verenler ile yanıt vermeyenler karşılaştırılırken yalnızca tedavi öncesinde miRNA elde edilen hastalar değerlendirmeye alınmıştır. Bu gruplardaki miRNA ifade düzeyleri istatiksel analize alınan hasta sayıları her bir miRNA için ; miR-17 geni için 21 birey, miR-18a geni için 20 birey, miR-19a geni için 21 birey, miR-19b geni için 19 birey, miR-20a geni için 21 birey ve miR-92a geni için 23 birey şeklindedir.

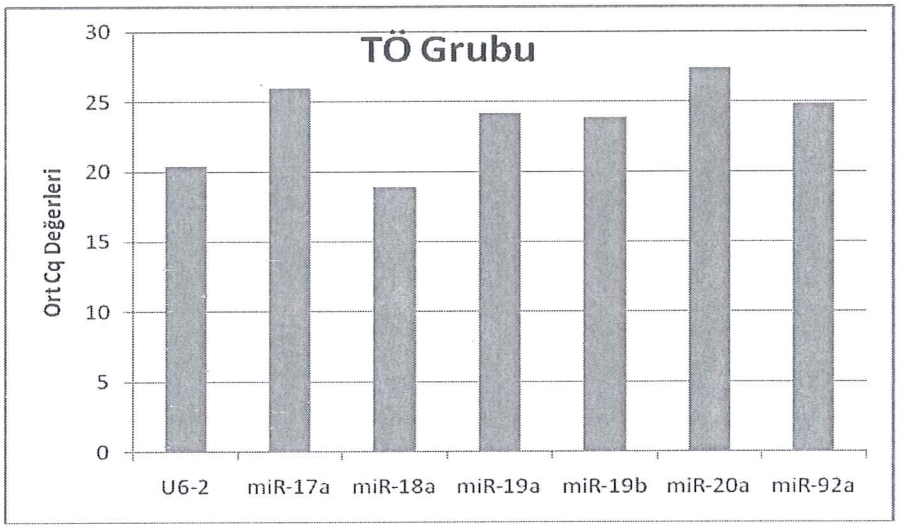
4.1.1.Tedavi Öncesi,Tedavi Sonrası ve Kontrol Gruplarının Karşılaştırılması

Hastaların tedavi öncesinde ve sonrasındaki örneklerinden ve kontrol grubu örneklerinden elde edilmiş olan miR-17-92 gen kümesi üyelerinin ortalama Cq değerleri Tablo 4.1'de verildiği gibidir. Bu ortalama değerlerin her bir grup için çizilmiş olan grafikleri Şekil 4.1, 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrasındaki hasta grupları "Mann Whitney U" testi kullanılarak ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında; hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrasındaki miRNA ifade düzeylerinin miR-19b hariç diğer miRNA'ların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptandı ($p<0.05$) (Tablo 4.2). miR-19b ise tedavi öncesi grupta kontrol grubundan farklılık göstermezken ($p=0.06$), tedavi sonrası grupta kontrol grubuna göre artmıştır ($p=0.04$).

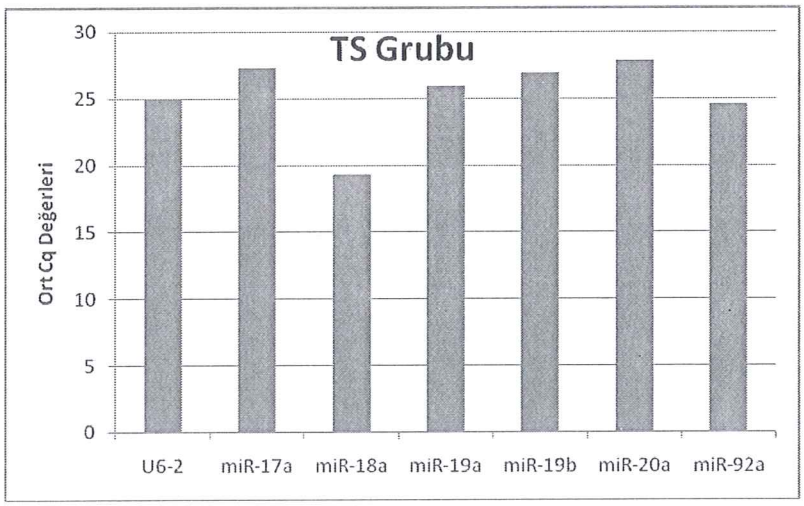
Tablo 4.1. Tedavi öncesi ve sonrası hasta gruplarının ve kontrol grubunun ortalama Cq değerleri

Hasta	U6-2	miR-17	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-20a
TÖ	20,38333	25,8981	24,15429	23,79947	27,34619	24,81696
TS	24,92348	27,2875	25,90125	26,86708	27,79458	24,54917
K	17,99172	23,68636	21,46875	24,88969	23,44485	22,35273

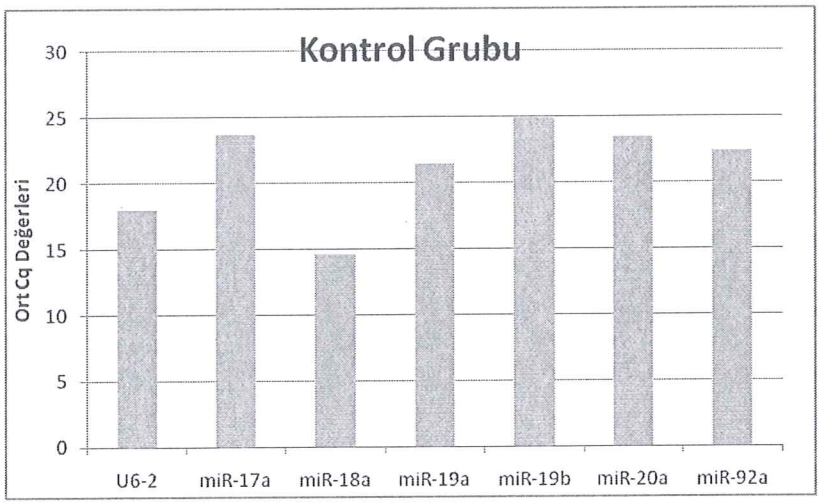
Şekil 4.1. Hastaların tedavi öncesine ait ortalama Cq değerleri



Şekil 4.2. Hastaların tedavi sonrasına ait ortalama Cq değerleri



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait ortalama Cq değerleri



Tablo 4.2. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin kontrol grubu ile karşılaştırılması (TÖ: tedavi öncesi, TS: tedavi sonrası, SD:Standart sapma (Yapılan analizde "Mann Whitney U" Testi kullanıldı).

	GRUPLAR	SAYI	DEĞER	SD	p
TÖ miR17	KONTROL	33	23,69	0,82	0,001
	HASTA	21	25,90	3,28	
TÖ miR 18a	KONTROL	33	14,56	1,60	0,001
	HASTA	20	18,84	2,67	
TÖ miR19a	KONTROL	32	21,47	1,12	0,001
	HASTA	21	24,15	1,29	
TÖ miR19b	KONTROL	32	24,89	3,06	**0,067**
	HASTA	19	23,80	1,33	
TÖ miR20a	KONTROL	33	23,44	1,50	0,001
	HASTA	21	27,35	4,03	
TÖ miR92a	KONTROL	33	22,35	3,04	0,001
	HASTA	23	24,82	1,82	
TS miR17	KONTROL	33	23,69	0,82	0,001
	HASTA	24	27,29	2,27	
TS miR 18a	KONTROL	33	14,56	1,60	0,001
	HASTA	24	19,31	2,95	
TS miR19a	KONTROL	32	21,47	1,12	0,001
	HASTA	24	25,90	2,52	
TS miR19b	KONTROL	32	24,89	3,06	**0,041**
	HASTA	24	26,87	2,85	
TS miR20a	KONTROL	33	23,44	1,50	0,001
	HASTA	24	27,79	3,07	
TS miR92a	KONTROL	33	22,35	3,04	0,007
	HASTA	24	24,55	1,47	

4.1.2.Tedavi Öncesi ve Sonrasındaki Grupların Karşılaştırılması

Tedavi öncesi ve sonrasında alınan örneklerden elde edilmiş olan miR-17-92 gen kümesi üyelerinin ifade düzeyleri "Wilcoxon Signed Ranks"testi ile analiz edildiğinde; miR-19a ve miR-19b'nin tedavi sonrasında tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği bulundu (p=0.001). Diğer miRNA genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmadı. (Tablo 4.3).

Elde edilen veriler ışığında, kontrol grubu ve U6-2 Housekeeping Primeri baz alındığında miR-17-92 gen kümesi üyelerinin primerlerine ait ifade düzeylerinin değişimi, yani kat değişim değerleri analiz edildiğinde; miR-17 geni için 7.69, miR-18a için 16.66, miR-19a için 6.97, miR-19b için 2.79, miR-20a için 17.08 ve miR-92a için 20.3 katı artış olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4, Şekil 7). Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde miR-19a ve 19b dışında farklılık olmadığı görülmektedir (Tablo 4.3).

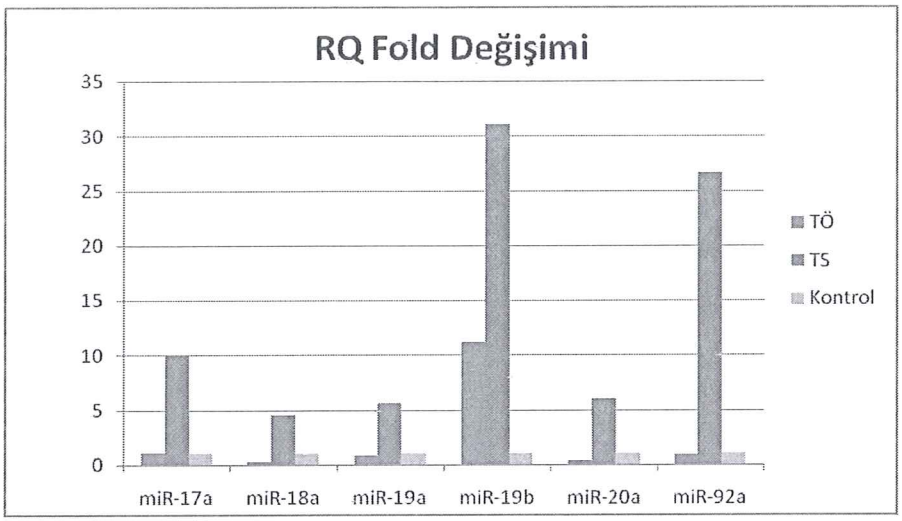
Tablo 4.3. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin karşılaştırılması (TÖ: Tedavi öncesi, TS:Tedavi sonrası, M:Ortalama, N:Hasta sayısı, SD: Standart sapma. (Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı)

miR 17-92 gen kümesi		M	N	SD	P
miR-17	TÖ	25,8981	21	3,27838	0,085
	TS	27,5205	21	2,28416	
miR-18a	TÖ	18,8410	20	2,66924	0,391
	TS	19,4975	20	3,18331	
miR-19a	TÖ	24,1543	21	1,29254	0,001
	TS	26,3067	21	2,39637	
miR-19b	TÖ	23,799	19	1,3293	0,001
	TS	26,5137	19	2,62219	
miR-20a	TÖ	27,3462	21	4,03274	0,786
	TS	27,685	21	3,2513	
miR-92a	TÖ	24,8170	23	1,82036	0,627
	TS	24,6404	23	1,43339	

Tablo 4.4. Tedavi öncesi ve sonrası hasta gruplarında kat değişim değerleri (TÖ: Tedavi öncesi, TS:Tedavi sonrası)

	miR-17	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-20a	miR-92a
TÖ	1,13	0,27	0,81	11,1	0,35	0,95
TS	10	4,5	5,65	31	5,98	26,63
Kontrol	1	1	1	1	1	1

Şekil 4.4. Kontrol grubu ve U6-2 Housekeeping Primeri baz alınarak hesaplanan miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a ve miR-92a kat değişim değerleri.



4.1.3.Tedaviye Yanıt Durumuna Göre Değerlendirme

Tedavi sonrasındaki hastalar tedaviye yanıt veren ve yanıt vermeyen olarak iki gruba ayrıldı. Bu grupların tedavi öncesi ve sonrasına ait miRNA ifade değerleri tedaviye yanıt olan ve olmayan gruplarda ayrı ayrı "Wilcoxon Signed Ranks" testi kullanılarak analiz edildi. Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunda tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki miRNA ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 4.5). Tedaviye yanıt veren hasta grubunda, tedavi sonrasında miR19a ve miR-19b'nin ifade düzeylerinde tedavi öncesine göre artış olduğu saptandı (sıra ile p=0.001, p=0.009). Diğer miRNA'lar bakımından anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna varıldı (Tablo 4.5). Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki ortalama Cq değerleri Tablo 4.6'da verildiği gibidir. Tedaviye yanıt vermeyen hastaların tedavi öncesi örneklerinden elde edilen ortalama Cq değerlerinin grafiği şekil 4.6'da, tedavi sonrasındaki ifade değerleri

grafiği Şekil 4.6'da verilmiştir. Tedaviye yanıt veren hastaların tedavi öncesindeki ortalama Cq değerleri grafiği Şekil 4.7'de, tedavi sonrasındaki ortalama Cq grafiği ise Şekil 4.8'de verildiği gibidir.

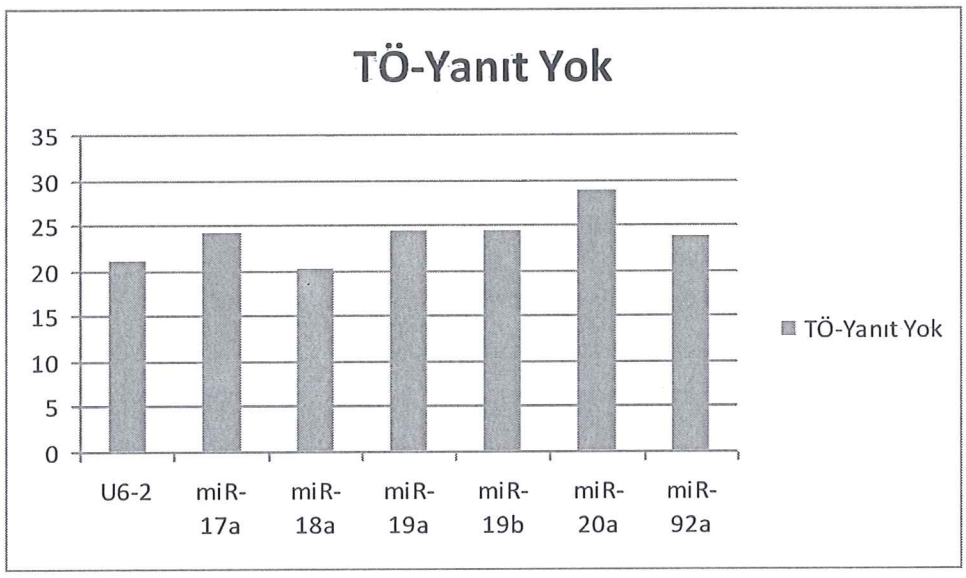
Tablo 4.5. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında ayrı ayrı karşılaştırılması. (TÖ(-): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi öncesi , TÖ(+): Tedaviye yanıt veren hasta grubunun tedavi öncesi, TS(-): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi sonrası, TS(+): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi sonrası, N: Sayı, M: Ortalama, SD: Standart Sapma. (Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı)

YANIT			Mean	N	SD	P
YANIT YOK	miR17	TÖ(-)	24,1800	4	6,08076	0,144
		TS(-)	28,1575	4	1,75021	
	miR18a	TÖ(-)	20,055	4	4,1850	0,144
		TS(-)	17,2025	4	2,45398	
	miR19a	TÖ(-)	24,3150	4	1,85714	0,273
		TS(-)	25,0525	4	2,19050	
	miR19b	TÖ(-)	24,2625	4	1,76715	0,068
		TS(-)	28,9650	4	3,88095	
	miR20a	TÖ(-)	28,7975	4	3,34181	0,144
		TS(-)	26,2375	4	2,23500	
	miR92a	TÖ(-)	23,7520	5	2,47150	0,686
		TS(-)	23,9940	5	,93655	
YANIT VAR	miR17	TÖ(+)	26,3024	17	2,36436	0,227
		TS(+)	27,3706	17	2,41289	
	miR18a	TÖ(+)	18,537	16	2,2429	0,079
		TS(+)	20,0713	16	3,14256	
	miR19a	TÖ(+)	24,1165	17	1,19736	0,001
		TS(+)	26,6018	17	2,40682	
	miR19b	TÖ(+)	23,6760	15	1,23498	0,009
		TS(+)	25,8600	15	1,85424	
	miR20a	TÖ(+)	27,0047	17	4,19336	0,723
		TS(+)	28,0259	17	3,41023	
	miR92a	TÖ(+)	25,1128	18	1,55719	0,472
		TS(+)	24,8200	18	1,51508	

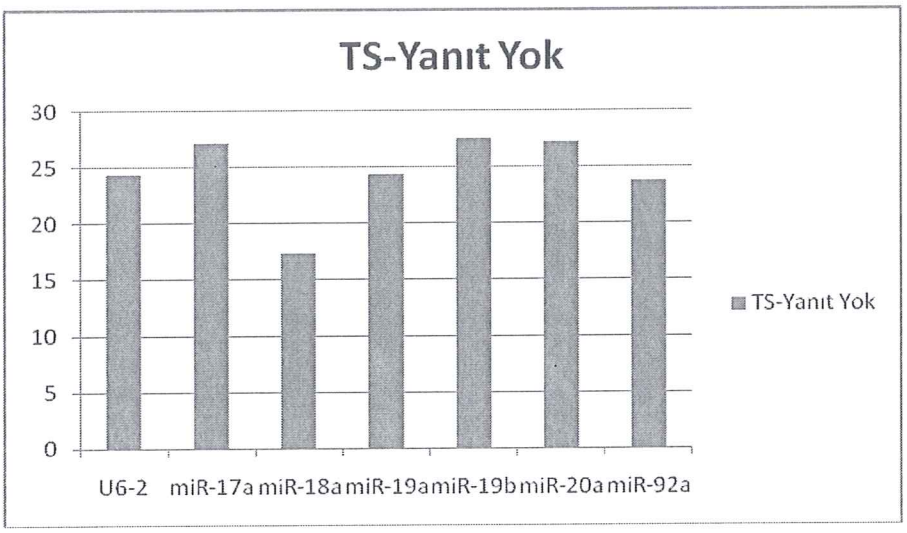
Tablo 4.6. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki ortalama Cq değerleri (TÖ(-): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi öncesi , TÖ(+): Tedaviye yanıt veren hasta grubunun tedavi öncesi, TS(-): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi sonrası, TS(+): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi sonrası).

	U6-2	miR-17	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-20a	miR-92a
TÖ(-)	21,0150	24,1800	20,0550	24,3150	24,2625	28,7975	23,7520
TÖ(+)	20,2028	26,3023	18,5375	24,1164	23,6760	27,0047	25,1127
TS(-)	24,4083	27,1083	17,3950	24,4116	27,5400	27,2150	23,7366
TS(+)	25,1052	27,3472	19,9444	26,3977	26,6427	27,9877	24,8200
Kontrol	17,9917	23,6863	14,5563	21,4687	24,8896	23,4448	22,3527

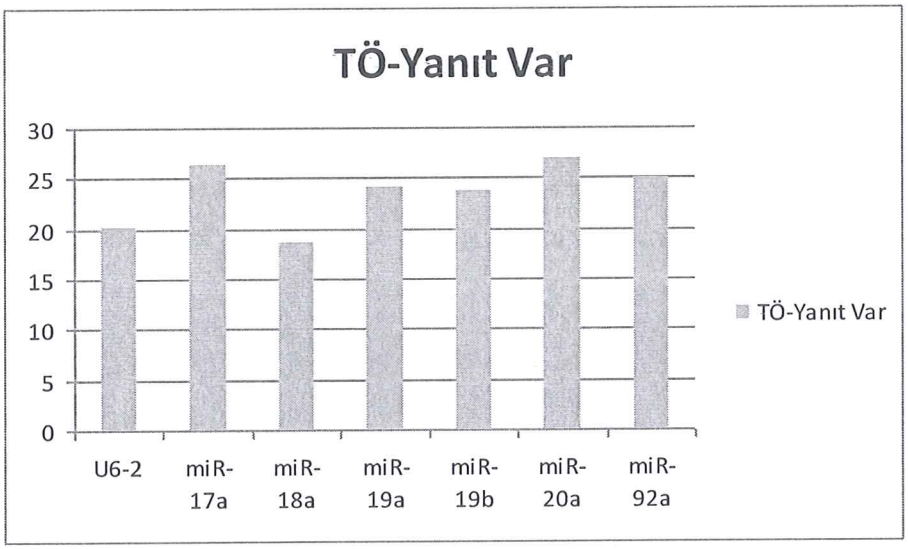
Şekil 4.5. Tedavi öncesi ve sonrasındaki değerlerin tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında ayrı ayrı karşılaştırılması (TÖ: Tedavi öncesi).



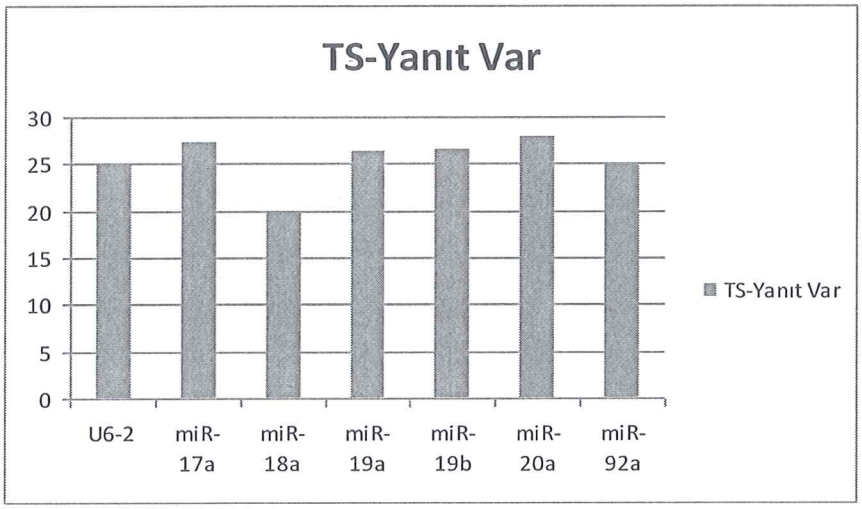
Şekil 4.6. Tedaviye yanıt vermeyen hastaların tedavi sonrası örneklerinde ortalama Cq değerleri (TS: Tedavi sonrası).



Şekil 4.7. Tedaviye yanıt veren hastaların tedavi öncesi örneklerinde ortalama Cq değerleri (TÖ: Tedavi öncesi).



Şekil 4.8. Tedaviye yanıt veren hastaların tedavi sonrası örneklerinde ortalama Cq değerleri (TS: Tedavi sonrası).

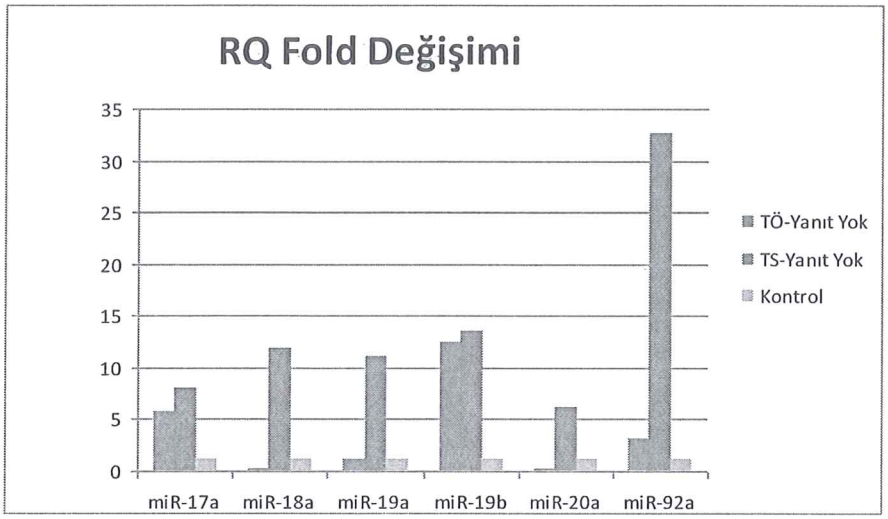


Tedavi öncesindeki değerlerinin tedaviye yanıt verip vermemelerine göre kat değişim oranları hesaplandığında miR-17 geninde yanıt verenlerde 7.66 kat, miR-19b geninde 1.17 kat, miR-92a geninde 4,52 kat azalmış olduğu, miR-18a geninde 0.61 kat, miR-19a geninde 1.52 kat, miR-20a geninde 0.51 kat artmış olduğu Tablo 4.8. da gösterilmiştir. Kat değişim oranlarının grafikleri şekil 4.9 ve 4.10'da verildiği gibidir.

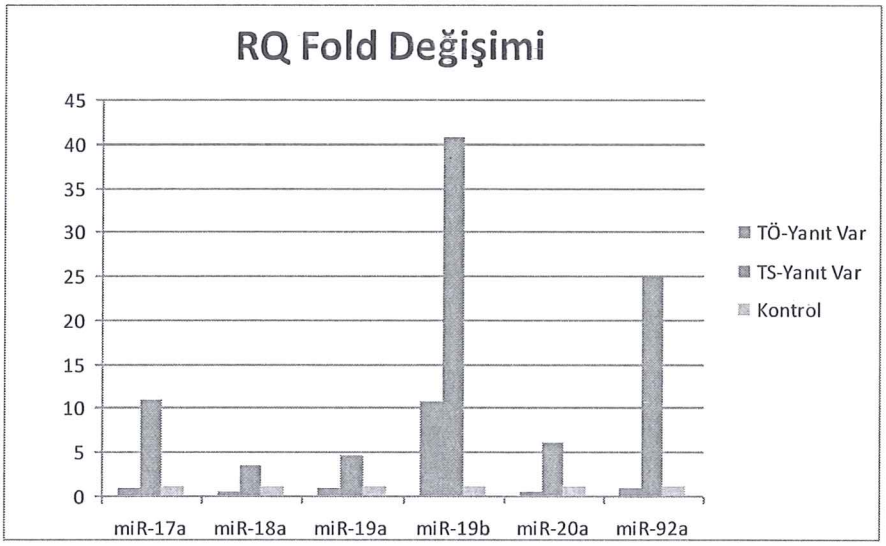
Tablo 4.7. Tedaviye yanıt veren ve vermeyen hasta gruplarında tedavi öncesi ve tedavi sonrasının kat değişim değerleri (TÖ(-): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi öncesi , TÖ(+): Tedaviye yanıt veren hasta grubunun tedavi öncesi, TS(-): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi sonrası, TS(+): Tedaviye yanıt vermeyen hasta grubunun tedavi sonrası).

	miR-17	**miR-18a**	**miR-19a**	**miR-19b**	**miR20a**	**miR92a**
TÖ(-)	5,75	0,179	1,13	12,5	0,2	3,08
TÖ(+)	0,75	0,29	0,74	10,65	0,39	0,68
TS(-)	7,94	11,83	11,06	13,45	6,21	32,67
TS(+)	10,92	3,29	4,53	40,78	5,93	24,93
Kontrol	1	1	1	1	1	1

Şekil 4.9. Tedaviye yanıt vermeyen grubun tedavi öncesi ve sonrasındaki ve kontrol gruplarının kat değişim değerleri



Şekil 4.10. Tedaviye yanıt veren grubun tedavi öncesi ve sonrasındaki ve kontrol gruplarının kat değişim değerleri



5. TARTIŞMA

Genetik ve epigenetik etkiler ile kanser gelişim sürecinde rolleri olan miRNA'lar hedef genlerin mesajcı RNA'larına bağlanarak bu genlerin ifadelerini düzenlemektedirler. Bu küçük RNA'ların kanser gelişiminde önemli fonksiyonlarının olması, onları kanser tedavisinde çekici bir tedavi hedefi haline getirmektedir.

MiRNA'lar hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi biyolojik olaylarda görev alırlar (148,149). Bazı miRNA'lar tümör baskılayıcı veya onkogenik etki göstererek hücre döngüsünün bozulmasına neden olarak çeşitli kanser türlerinin gelişiminde rol alabilmektedir (149,150). Bu miRNA'ların hematolojik kanserlerde de önemli ölçüde etkisinin olduğu ortaya konmuştur (151,152). Hematolojik kanser (akut myelositer lösemi, multiple myeloma, kronik lenfositer lösemi, akut lenfoblastik lösemi gibi) hastalarında tedaviye yanıt, hastalar arasında farklılık göstermektedir. Bu nedenle tedavi edici doğal ajanların test edilmesine ihtiyaç vardır. Buradan yola çıkarak planlanmış olan bu araştırmada; hastalarda tedaviye yanıt ile bir grup özgül miRNA'lar (miR-17-92 gen kümesi) arasındaki ilişkinin analiz edilmesi hedeflenmiştir.

Farklı kanser türlerinin kendilerine özgü miRNA ifade profilleri olduğu görülmektedir. Kronik lenfositik lösemi, meme, kolorektal, over, karaciğer, akciğer, pankreas ve prostat kanseri gibi çeşitli kanserlerde belirli miRNA'ların hastalığın evresi, metastatik potansiyeli, histolojik alt tipi ve sağ kalım gibi çeşitli klinik karakteristikleri ile ilişki gösterdiği anlaşılmıştır. Belirli miRNA ifade profillerinin bir çeşit tümör belirteci olarak kullanılabileceği, bunlardan tanı ve prognozda yararlanılabileceği bilinmektedir (153). Yapılan hayvan deneyleri de onkogen ve tümör baskılayıcı gen etkili miRNA'ların gen ifadelerinin değişmesi ile, kanserlerin tanı, prognoz ve tedavisinde miRNA'ların kullanılabileceğini göstermektedir (154).

MiRNA'lar ve kanser arasındaki ilk bağlantı bazı miRNA'ların hücre döngüsünü düzenlediğinin belirlenmesi ve bu miRNA'ların bazılarının kanserle ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde bulunduğunun anlaşılması ile ortaya çıkmıştır (155). miRNA'ların karsinogenezde etkili olabileceklerinin anlaşılmasından sonra bir çok çalışmada farklı kanser türlerinde özgül bir hücre tipinde ifade edilen miRNA'ların (miRNom) ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. İlk olarak miRNom'un normal ve

patolojik dokular arasında farklılık gösterdiği belirlenmiştir (155). Bu farklılıkların incelenmesi ile ilgili gen ifadesi üzerinde kontrolü kalkmış olan miRNA'lar tespit edilerek, insan kanserlerinde etkili olan miRNA'lar ve patolojik rolleri belirlenebilir (156). miRNA moleküllerinin çeşitli tümörlerde aşırı ifade oldukları ya da ifadelerinin azaldığı saptanmıştır. Örneğin, kronik lenfositik lösemide sıklıkla delesyona uğrayan 13q14 bölgesinde miR-15a ve miR-16a genlerinin bulunduğu ve olguların yaklaşık üçte ikisinde bu iki miRNA ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada her iki miRNA molekülünün antiapoptotik etkili bir gen olan BCL2 ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada baskıladığı gösterilmiştir. Bu gözlem miR15a ve miR16'nın tümör baskılayıcı işlevleri olduğunu düşündürmektedir. Diğer bazı miRNA'ların ise ifade düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir (157,158). Yine 13 numaralı kromozom'da q31'de bulunan miR-17-92 miRNA grubunun ifadesinin akciğer kanseri ve çeşitli tipte lenfomalarda arttığı saptanmıştır. Bu moleküllerin hedefleri arasında PTEN ve RB2 tümör baskılayıcı genlerinin bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu da, miR-17-92 miRNA grubunun onkogenik etkili olduğunu göstermektedir (159,160). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda hematolojik kanserlerde sıklıkla ifade düzeyleri değişen miRNA'lar; miR-15a/16-1 gen kümesi, miR-17-92 gen kümesi ve miR-155 olarak belirlenmiştir. KML ve ALL'de tanı ve takipte özellikle miR-17-92 gen kümesinin kullanılabileceği bildirilmektedir (161). Bizim araştırma sonuçlarımızda hastalarda tanı döneminde alınan yani tedavi öncesi olarak tanımladığımız hasta grubunun miR17-92 gen kümesi üyelerinin tümünün ifade düzeyleri sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde artış gösterdikleri saptanmıştır ($p=0.001$). Bu gen kümesinin onkogenik etkisi tümör baskılayıcı PTEN ve BIM'i etkileyerek olmaktadır ki bunlar da B-lenfositlerin apoptozisini kontrol etmektedirler (162). miR-17-92 gen kümesi içinde onkogenik transformasyon özelliği yüksek olan miR-19'dur. Çalışma sonuçlarımızda tedavi öncesi ve tedavi sonrasında alınan örneklerde miR17-92 gen kümesi üyelerinin ifade düzeyleri karşılaştırıldığında; miR-19a ve miR-19b'nin tedavi sonrası grupta tedavi öncesine göre artmış olduğu belirlendi ($p=0.001$). Diğer gen kümesi üyelerinde tedavi sonrasında farklılık saptanmadı. Tedavi sonrasında tedaviye yanıt veren hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki örnekleri karşılaştırıldığında miR-19a ve miR-19b'nin ifade düzeylerinin artmış olduğu bulundu (sıra ile; $p=0.001$, $p=0.009$). miR-19 PTEN hedeflenmesinde ve PI3K-Akt-mTOR yolağının aktive olmasına neden olduğundan kanserin ilerlemesine neden olmaktadır (163).

Sonuç olarak hematolojik kanser tanısı almış olan hasta grubunda miR-17-92 gen kümesi üyelerinin ifade düzeylerinde kontrole göre artış vardır. Onkogenik etkili olan bu miRNA'lar için beklenen ve bilinen bir sonuçtur. Tedavi aldıktan sonra ki grup ile tedavi öncesi grup arasında miR-17-92 gen kümesi üyelerinin ifade düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bu hastalara uygulanmakta olan tedavinin miR-17-92 gen kümesi üyelerinin ifade düzeyleri üzerinde bir etkisi bulunmadığını göstermektedir. Tedavi yanıtına göre yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre; tedaviye yanıt veren grubun tedavi sonrasında tedavi öncesine göre miR19a ve miR-19b'nin ifade düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır. Tümörlerin ilerlemesine yol açan miR-19'da saptanan bu artış, miR-19'un tedavi hedefi olabileceğini işaret etmektedir. Bu konuda yapılacak olan ileri analizlere katkısının olacağı düşünülmektedir.

Belirli miRNA'lar ile onların hedefleri arasındaki ilişkinin araştırılması ve kanserde etkili miRNA'ların normal ve kanserli hücreler arasındaki farkının ortaya çıkarılması oldukça önemlidir. Her bir çalışma ile yapılacak olan katkılar tümör tipine özgü miRNA ve bunların ilişkili oldukları hücresel yolaklar yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önem teşkil etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Altıok E. Kanser Tanı Ve Tedavisinde Genetik Devrim: Moleküler Onkoloji Acıbadem Genetik Tanı ve Hücre Tedavi Merkezi, 2008;1-3.

2. Ekmekçi A., Konaç E., Önen H.İ. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkınlık, Marmara Medical Journal 2008;3: 282-295.

3. Pala F.S. Hematolojik Kanserlerde FISH Uygulamaları, Trakya Ünv Tıp Fak. Dergisi 2005;31: 32-136.

4. Deviren A. Hematolojik malignitelerde sitogenetik inceleme, Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maligniteler, sempozyum dizisi. 2005;45:75-81.

5. Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O' Brein-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L. and Coukos, G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. PNAS 2006; 103:9136-9141.

6. www.mirbase.org/cgi-bin/miRNA

7. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? Sci STKE. 2007;1:367.

8. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004; 431:3505.

9. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. Am J Pathol. 2009; 174:1131–8.

10. Kocerha J, Kauppinen S, Wahlestedt C. MicroRNAs in CNS disorders. Neuromol Med. 2009; 11:162-72.

11. Barringhaus K, Zamore P. MicroRNAs: regulating a change of heart. Circulation. 2009; 119:2217-24.

12. Nicoloso MS, Spizzo R, Shimizu M, Rossi S, Calin GA. MicroRNAs-the micro steering wheel of tumour metastases. Nat Rev Cancer 2009;9:293-302.

13. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencin. Cel.l 2007; 131: 63-73.

14. Çetingöz, R., Kentli, S., Uruk, Ö., DemirtaĞ, E., Eyiler, F., Kınay, M. Turkish People"s Knowledge of Cancer and Attitudes Toward Prevention and Treatment. Journal of Cancer Education,2002; 17: 55-58.

15. Turgay, A. S., Sarı, D., Türkistanlı E. Ç. Knowledge, Attitudes, Risk Factors, and Early Detection of Cancer Relevant to the Schoolteachers in İzmir. Turkey. Preventive Medicine.2004; 40:636-641.

16. Tuncer, A. M. Kanserin Ülkemiz ve Dünyada Önemi, Hastalık Yükü ve Kanser Kontrol Politikaları. İçinde Tunçer, A. M. (Ed.), Türkiye'de Kanser Kontrolü. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı Yayınları 2007;707.

17. Boyle, P.ve Levin, B. Dünya Kanser Raporu. Lyon: Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu. 2008; http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p1-104.pdf.

18. Yamazhan, T. ve Tunçel, M. Bakteri-Kanser İliŞkisi. İnfeksiyon Dergisi.2003;17: 117-121.

19. Philippe Rochigneux , Michel Resbeut, Frédérique Rousseau, Erwan Bories, Jean-Luc Raoul , Flora Poizat and Laurence Moureau-Zabotto, Kominski. Radio(chemo)therapy in elderly patients with esophageal cancer: a feasible treatment with an outcome consistent with younger patients. Front Oncol. 2014:4:100.

20. Kaminski RM, Rogawski MA,Klitgaard H. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments. Neurotherapeutics.2014;11:385-400.

21. Al-Otaiby M, Tassi E, Schmidt MO, Chien CD, Baker T, Salas AG, Xu J, Furlong M, Schlegel R, Riegel AT, Wellstein A. Role of the Nuclear Receptor Coactivator AIB1/SRC-3 in Angiogenesis and Wound Healing. Am J Pathol. 2012;180:1474-84

22. Ravandi F,Kadkol SS, Ridgeway J, Bruno A, Dodge C, Lindgren V. Molecular identification of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts in an AML M4Eo

patient in the absence of inv16 or other abnormality by cytogenetic and FISH analyses a rare occurrence. Leukemia. 2003;17:1907-10.

23. Zhang T, Fu Q, Gao D, Ge L, Sun L, Zhai Q. EBV associated lymphomas in 2008 WHO classification. Pathol Res Pract. 2014;210(2):69-73.

24. Aktuglu G. Akut lösemiler, Kronik lösemiler. Ed: Yazıcı H., Hamuryudan V., Sonsuz A. Cerrahpasa İç Hastalıkları.2005; 183-206.

25. Haznedar R., Yamaç K. Akut lösemiler. Ed: Elçin G., Biberoglu K., Süleymanlar G., Ünal S. Temel İç Hastalıkları. 2003; 1900-1912, Günes Kitabevi, Ankara.

26. Martelli AM, Lonetti A, Buontempo F, Ricci F, Tazzari PL, Evangelisti C, Bressanin D, Cappellini A, Orsini E, Chiarini F. Targeting Signaling Pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia initiating cells. Adv Biol Regul. 2014;30(14):00006-2.

27. Robinson HM, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harewood L, Harris RL, Jalali GR, Martineau M, Moorman AV, Taylor KE, Richards S, Mitchell C, Harrison CJ. Amplification of AML1 in acute lymphoblastic leukemia is associated with a poor outcome. Leukemia. 2003;17:2249-2250.

28. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, Raffoux E, Leblanc T, Thomas X, Hermine O, Quesnel B,Baruchel A, Leverger G, Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factoracute myeloid leukemia (CBF-AML). Leukemia. 2006;20(6):965-70.

29. Zhao X, Chen A, Yan X, Zhang Y, He F, Hayashi Y, Dong Y, Rao Y, Li B, Conway RM, Maiques-Diaz A, Elf SE, Huang N, Zuber J, Xiao Z, Tse W, Tenen DG, Wang Q, Chen W, Mulloy JC, Nimer SD, Huang G. Downregulation of RUNX1/CBFβ by MLL fusion proteins enhances hematopoietic stem cell self-renewal. Blood. 2014;123(11):1729-38.

30. Rahgozar S, Moafi A, Abedi M, Entezar-E-Ghaem M, Moshtaghian J, Ghaedi K, Esmaeili A, Montazeri F. mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. Cancer Biol Ther. 2014;15(1):35-41.

31. Hoffman R., Benz E.J., Shattil S.J., Furie B., Silberstein L.E., McGlave P., Heslop H., Hematology Basic Principles and Practice 2009.

32. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, Schmid C, Wendtner CM, Staib P, Serve H, Kreuzer KA, Kern W, Haferlach T, Haferlach C. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. Blood. 2012;120(15):2963-72.

33. Bernués M, Durán MA, Puget G, Iglesias J, Galán P, Vercher FJ, Besalduch J, Rosell J. Genetics of lymphocytes influences the emergence of second cancer in chronic lymphocytic leukemia. Anticancer Res. 2014;34(5):2311-4.

34. Ohno Y, Yasunaga S, Janmohamed S, Ohtsubo M, Saeki K, Kurogi T, Mihara K, Iscove NN, Takihara Y. Hoxa9 transduction induces hematopoietic stem and progenitor cell activity through direct down-regulation of geminin protein. PLoS One. 2013;8(1):e53161.

35. Ahmad EI, Gawish HH, Al Azizi NM, Elhefni AM. The prognostic impact of K-RAS mutations in adult acute myeloid leukemia patients treated with high-dose cytarabine. Onco Targets Ther. 2011;4:115-21.

36. Catherine C. Smith, Qi Wang, Chen-Shan Chin, Sara Salerno, Lauren E. Damon, Mark J. Levis, Alexander E. Perl, Kevin J. Travers, Susana Wang, Jeremy P. Hunt, Patrick P. Zarrinkar,, Eric E. Schadt,, Andrew Kasarskis, John Kuriyan, and Neil P. Shah, Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. Nature. 485(7397): 260–263.

37. Wander SA.,Lvevis MJ.,The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. 2014 Jun;5(3):65-77.

38. Ren R.,Dissecting the molecular mechanism of chronic myelogenous leukemia using murine models. Leukemia and Lymphoma. 2002;43:1549-1561.

39. Wetzler M., Byrd C.J., Bloomfield D.C.:Akut ve Kronik Myeloid Lösemiler. Çeviri Ed: Berksoy S. Harrison. İç Hastalıkları Prensipleri. 2004; 706-714, Nobel Tıp Kitabevleri.

40. Haznedaroğlu C.İ. Kronik Myeloid Lösemi (KML), Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu.2007; 34-35.

41. Wang S.E., Berliner N. Hematopoetik kök hücresinin klonal bozuklukları. Çeviri Ed: Çavusoglu H., Cecil Essentials of Medicine Türkçesi. Besinci Edisyon. 2002;410-418.

42. Kıpps J.T.: Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. In: Ed: Lıchtman A.M., Beutler E., Kıpps J.T., Selıgsohn U., Kaushansky K., Prchal T.J., Williams. Hematology Seventh Edition. 2006;1343-1350.

43. Alkan S. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL): Patogenezi ve Biyolojisi, XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi, VIII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu, 2008;17-22.

44. Duman N. (2008). Kronik Lenfositik Lösemili Hastalarda Xrcc1 (X-Ray Cross Complementıng Group 1) Geninde Arg399Gln ve Arg194Trp Polimorfizmlerinin ve Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığı ile Korelasyonlarının Araştırılması, Sağlık Bilimleri Doktora Tezi.

45. Altuntaş F., Kaynar L., Eser B., Sarı İ., Kaplan B., Özkan M., Çetin M., Ünal A. Multipl Myeloma Tedavisinde Üç Farklı Konvansiyonel Kemoterapi Protokolünün Karşılaştırması: Tek Merkez Deneyimi, Türk Onkoloji Dergisi.2004 19, Sayı 1.

46. Sezer O. Multipl Miyelom: Güncel Tedavi, XXXI. Ulusal Hematoloji Kongresi VIII. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu. 2008; 40-50.

47. Aydın Y. Hematolojik Malignitelerin Klinik Belirtileri ve Fizik Muayene Bulguları, Hematolog Olmayanlar İçin Hematolojik Maligniteler, sempozyum dizisi. 2005;45: 09-23

48. Lacy J.: Lenfositlerin bozuklukları. Çeviri Ed: Çavusoglu H., Cecil Essentials of Medicine Türkçesi. Besinci Edisyon. 2002;435-448.

49. Azak A.: Lenfomalı (Hodgkin ve Non-Hodgkin) Hastalarda Yorgunluk Sendromu ve Etkileyen Faktörler. M.Ü. Saglık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul .2003 (Danışman: Yrd. Doç. Dr. S. Çınar).

50. Gördeles Beser N.: Kemoterapi Alan Lenfomalı Hastaların Yasam Kalitesi. H. Ü. Saglık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara. 2001.

51. Wang S, Medeiros LJ, Xu-Monette ZY, Zhang S, O'Malley DP, Orazi A, Zuo Z, Bueso-Ramos CE, Yin CC, Liu Z, Miranda RN, Young KH . Epstein-Barr virus-positive nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma.Ann Diagn Pathol. 2014:S1092-9134(14)00032.

52. Armitage J.O., Longo D.L.: Lenfoid hücre malignensileri. Çeviri Ed: Bolaman Z., Harrison ç Hastalıkları Prensipleri. 2004; 715-726.

53. Yamaç K.: Hodgkin dısı lenfoma, Hodgkin hastalıgı. Ed: liçin G., Biberoglu K., Süleymanlar G., Ünal S., Temel ç Hastalıkları. 2003;1913-1937.

54. Voorhoeve, P. M. & Agami, R. Classifying microRNAs in cancer: the good, the bad and the ugly. Biochim Biophys Acta1775. 2002; 274-28.

55. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res19. 2009;92-105.

56. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids. 2011; D152-157.

57. Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. & Enright, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids. 2008;D154-158.

58. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. The C. Elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993; 75, 5, 843-854 p.

59. Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. Science 2001; 294:797–799.

60. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature 2000;403,901–906.

61. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 2000;408(6808):86–89.

62. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 2001;294:853–858.

63. Ambros V, Bartel B, Burge CB. A uniform system for microRNA annotation. RNA. 2003;9:277–279.

64. Jones SG, Saini HK. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Research, 2008;36: D154–D158.

65. Kim VN. MicroRNA Biogenesis: Coordinated Cropping and Dicinig. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005;6(5):376-385.

66. Christian L, Hinske G. Silencing the host-the role of intronic microRNAs. Doctoral thesis. Ludwig-Maximilians-Universitat München, Master of Science İn Biomedical Informatics at the Massachusetts Institute of Technology, Germany, February 2009.

67. Lagana A, Russo F, Sismeiro C, Giugno R, Pulvirenti A. Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material. Plos One. 2010;5(6):e11166

68. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. Cancer Sci 2010;101:2309-2315.

69. Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature 2003;425:415-419.

70. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.Nat Rev Cancer.2006;6:259-269.

71. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. Science 2004;303:95-98.

72. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. EMBO. 2002; 21:5875-5885.

73. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell. 2005;123:631-640.

74. He L, Hannon, G J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004; 5:522–31.

75. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer Metastasis Rev. 2009;28:369–378.

76. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. Annu Rev Biomed Eng 2010;12:1-27

77. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms fora tiny RNA? RNA. 2005;11:1753–1761.

78. Lee J, Li Z, Sinning RB, John B. Regulatory circuit of human microRNA biogenesis. Plos Comput. Biol. 2007;3(4):e67.

79. Sanchez MAV, Liu J, Hannon GJ. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev. 2006;20:515-524.

80. Mathonnet G. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. Science. 2007;317(5845):1764-1767.

81. Cui Q, Yu Z, Purisima EO, Wang E. Principles of microRNA regulation of a human cellular signaling network. Mol. Sys. Biology. 2006;2(46);1-7.

82. Snead NM, Rossi JJ. Biogenesis and function of endogenous and exogenous siRNAs. W. Interdiscip. Rev. RNA. 2010;1(1):117-31.

83. Villar-Menéndez I, Porta S, Buira SP, Pereira-Veiga T, Díaz-Sánchez S, Albasanz JL, Ferrer I, Martín M, Barrachina M. Increased striatal Adenosine A2A receptor levels is an early event in Parkinson's disease-related pathology and it is Potentially Regulated by miR-34b. Neurobiol Dis. 2010;S0969-9961(14):00148-X.

84. Wang Z, Yang B. MicroRNA expression detection methods. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010:Chapter 1,3-40

85. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers.Nat Rev Cancer. 2006;6(11):857-66.

86. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(9):2999-3004.

87. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res. 2005;33:1290-7.

88. Tanno B, Cesi V, Vitali R, Sesti F, Giuffrida ML, Mancini C et al. Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells. Cell Death and Differentiation 2005;12:213-23.

89. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. Mamm Genome. 2006;17(3):189-202.

90. Zhou YM, Chen LJ, Barlogie B, Stephens O, Wu XS, Williams DR, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2010;107:7904-9.

91. Kim YK, Yeo J, Ha M, Kim B, Kim VN. Cell adhesion- dependent control of microRNA decay. Molecular Cell. 2011;43:1005.14

92. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99:15524-9.

93. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(39):13944-9.

94. Michael MZ, O.Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. Mol Cancer. 2003;1:882.91

95. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. Moleculer Oncology. 2010;4:230-41.

96. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2004;39:167.9.

97. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res 2005;65:6029.33.

98. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanorachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:19075.80.

99. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittman M, Ozen M. The function microRNAs, small potent molecules in human prostate cancer. Prostate Cancer. 2010;13:208-17.

100. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisowa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer. 2005;65:9628.32

101. Lamy P, Andersen CL, Dyrskjøt L, Tørring N, Ørntoft T, Wiuf C. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? Br J Cancer. 2006;95(10):1415-8.

102. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer. 2004;64(11):3753-6.

103. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. Cell 2005;120:635-47.

104. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature. 2005;435:839-43.

105. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. Cell. 2007;131:1109-23.

106. Iorio MV, Ferracin M, Liu C, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Research. 2005;65:7065-70.

107. Lars D, Marie S and Jesper B. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. Cancer. 2009;69:4851-60.

108. James W F, Saiful M, Helen C O, Freddie C H.Distinct microRNA alterations characterize high and low grade cancer. Cancer. 2009;69:8472-81.

109. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y,et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. Oncogene. 2009;28(10):1385-92.

110. Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Iio A, Itoh T, Kojima K, et al. Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. Cancer Gene Ther. 2010;17(6):398-408.

111. Saetrom P, Biesinger J, Li S M, Smith D, Thomas L F, Majzoub K,et al. A risk variant in an miR-125b binding site in BMPR1B is associated with breast cancer pathogenesis. Cancer. 2009; 69(18):7459-65.

112. Gefen N, Binder V, Zaliova M, Linka Y, Morrow M, Novosel A, et al. Hsa-mir 125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. Leukemia. 2010; 24(1): 89-96.

113. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A,et al. MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. 2006;103:9136-41.

114. Jiang JM, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. Nucleic Acids. 2005;33:5394.5403.

115. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M. Frequent deletions and down regulation of microRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. PNAS. 2002;99: 15524 -15529 .

116. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Ageilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M. miR-15 and miR- 16 induce apoptosis by targeting BCL2. PNAS. 2005 ;10, 39:13944-13999 p .

117. Sevli S, Uzumcu A, Solak M et al. The function microRNAs, small potent molecules in human prostate cancer. Prostate Cancer. 2010;13:208-217.

118. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell. 2005;120:635–647.

119. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005;353:1793–801

120. Lin PY, Yu SL, Yang PC. MicroRNA in lung cancer. Brit J Cancer. 2010;103:1144-1148.

121. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer. 2005;65:7065–7070.

122. Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. Blood. 2008;111:3183–3189.

123. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. Oncogene. 2007;26:6133–140.

124. Bruchova H, Merkerova M, Prchal JT. Aberrant expression of microRNA in polycythemia vera. Haematologica. 2008;93:1009-1016.

125. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. Cancer. 2007;67:6031-6043.

126. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. Oncology. 2008;72:397-402.

127. Lin T, Dong W, Huang J, et al. MicroRNA-143 as a tumor suppressor for bladder cancer. J Urol. 2009;181:1372-1380.

128. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, et al. MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94:320-323.

129. Ma Q., Jiang Q., Pu Q. MicroRNA-143 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer and its relative mechanism. Int J Biol Sci. 2013 Jul 18;9(7):680-92.

130. Tam W, Ben-Yehuda D, Hayward WS. bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. Mol Cell Biol. 1997;17:1490–1502.

131. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:3627–3632.

132. Gironella M, Seux M, Xie MJ, et al. Tumor protein 53-induced nuclear protein expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104:16170–16175.

133. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. J Pathol. 2005;207:243–249.

134. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochem Biophys. 2005;334:1351–1358.

135. Volinia S, Calin G, Liu CG, et al. A microRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. Proc. Natl. Acad. Sci. 2006;103:2257–2261.

136. Meng F, Henson RH, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology. 2007;133:647–658.

137. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. Blood. 2007;110:1330–1333.

138. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, et al. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. J Biol Chem. 2008; 283:1026–1033

139. He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. Nature. 2005;435:828–833.

140. Mendell JT. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. Cell. 2008;133:217–222.

141. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature. 2005;435:839–843.

142. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol. 2009;4:199-227

143. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in humancancers.Nat Rev Cancer. 2006;6(11):857-66.

144. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. APMIS. 2007;115:1090 –1106.

145. Duan, R., Pak, C. and Jin, P. Single nucleotide polymorhism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. Human Molecular Genetics.2007;16:1124-1131 p.

146. Georges, M., Coppieters, W. and Charlier, C. Polymorphic miRNAmediated gen regulation:contribution to phenotypic variation and disease. Current Opinion in Genetics and Development. 2007;17:166 -176 p.

147. Fabbri, M., Ivan, M., Cimmino, A., Negrini, M. and Calin, G.A. Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer: the strange case of Dr Jekyl and Mr Hyde. Expert Opin.Biol. Ther. 2007;7:1009-1019 .

148. Alemdehy MF, Erkeland SJ.MicroRNAs: key players of normal and malignant myelopoiesis. Curr Opin Hematol. 2012;19:261-7.

149. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNAs gene are fequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2004;101,2999-3004.

150. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. EMBO Mol Med. 2012;4:143-59.

151. Persengiev SP. miRNAs at the crossroad between hematopoietic malignancies and autoimmune pathogenesis. Discov Med 2012;13:211-21.

152. Heuston EF, Lemon KT. The Beginning of the Road for Non-Coding RNAs in Normal Hematopoiesis and Hematologic Malignancies. Front Genet. 2011;2: 1-9.

153. Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. Blood. 2009; 114:e20-6.

154. Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, et al. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. Mamm Genome. 2006;17:189-202.

155. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer. 2005;65:7065-70.

156. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer. 2005;65:9628–32.

157. Chen L, Li C, Zhang R, Gao X, et al. miR-17-92 cluster microRNAs confers tumorigenicity in multiple myeloma. Cancer Lett. 2011;309:62-70.

158. Meng F, Henson RH, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. Gastroenterology 2007;133:647–58.

159. Ersoy Tunalı N, Tiryakioglu O. Kanserde MikroRNA'ların Rolü. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30:1690-700

160. Dong C, Ji M, Ji C. MicroRNAs and their potential target genes in leukemia pathogenesis. Cancer Biol Ther. 2009;8:200-5.

161. S.Patrick Nana-Sinkam, Muller Fabb, Carlo M. Croce. MicroRNAs in cancer:personalizing diagnosis and theraphy. Ann.N. Y. Acad. 2010;1210:23-33.

162. Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, He L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. Genes Dev. 2009 ;23:2839-49.

163. Olive V, Li Q, He L. mir-17-92: a polycistronic oncomir with pleiotropic functions. Immunol Rev. 2013; 253:158-66

ÖZGEÇMİŞ

01 Agustos 1986 yılında Adana'da doğdu. İlköğretimi, 29 Ekim İlköğretim Okulu'nda, ortaöğrenimini Özel Perihan Üçgül Ortaokulu'nda ve lise öğrenimini Adana Anadolu Erkek Lisesi'nde tamamladı.

2010 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden derece ile mezun oldu. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı. 2010 yılında evlendi ve bir kız çocuğu vardır.