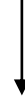




Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**T HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ
HASTALARDA MİKRORNA (MİRNA) GEN
ANLATIMININ TESPİTİ**

CEREN ÖZTUNÇ

**DANIŞMAN
PROF.DR.UĞUR ÖZBEK**

**GENETİK ANABİLİMDALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.

Ceren ÖZTUNÇ

İTHAF

Aileme ve Tüm Sevdiklerime..

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimi tamamlamam için önüme sunduğu bütün imkanlar ve destekleri için, Sayın Prof.Dr.Uğur Özbek'e,

Bu tezin her sayfasında emeği geçen, bilgi birikiminin yanı sıra, sabrını da benden esirgemeyen teşekkürlerin az kalacağı, Sayın Doç.Dr.Müge Sayitoğlu'na,

Tezimin ortaya çıkmasından, sonlanmasına kadar her basamakta katkısı olan, bilgi birikimini ve yardımlarını esirgemeyen, Sayın Dr. Özden Hatırnaz NG'ye,

Destekleri için Sayın Doç.Dr.Burçak Vural'a,

Teknik konularda ve deneysel aşamalarda yardımlarına başvurduğum ve sıcak dostlukları ile sadece laboratuvarı değil günlük hayatı da eğlenceli kılan sevgili arkadaşlarım İsmail Can, Suzin Tatonyan, Sinem Fırtına, Özkan Özdemir, Nurhan Mavi, Emrah Yücesan, Yücel Erbilgin'e,

DETAE'de yüksek lisansa başlamam ile hayatıma giren ve ondan sonra hayatımın her aşamasında yanımda olan ve olacak olan, tezim süresince hiçbir desteğini esirgemeyen, iş arkadaşından öte ebedi dostlarım Filiz Çavuş, Didem Altındirek ve Elif Uğurel'e,

Her türlü halime katlanan, hayatım süresince ihtiyacım olan desteği sağlayan ve her koşulda yanımda olduklarını içtenlikle hissettiren İstanbul'daki çekirdek ailem; betimlemede sözlerin hep yetersiz kalacağı Gökhan Türkal ve biricik dostum Çilen Kurt'a,

Ve tabii ki şehir dışındaki ailelerimizin yerine senelerdir birbirimizi koyup, koruduğumuz, birbirize hep destek olduğumuz, evlerimizi, yemeklerimizi, hayatımızı paylaştığımız hangibirini yazacağımı bilemediğim sayısız dostuma,

Son olarakta haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bilgi birikimlerine ve hayat görüşlerine hep hayran olacağım, eğitimci kişiliklerinden hep faydalanacağım canım annem ve babama,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19607

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Normal Hematopoez	3
2.1.1. Normal T Hücresi Gelişimi.....	5
2.2. Kanser Tanımı.....	8
2.2.1. Lösemi Tanımı ve Sınıflandırılması	8
2.2.2. T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi.....	10
2.3. Küçük ribonükleik asitler (“small RNA”)	11
2.3.1. MiRNA	15
2.4. miRNA ve Hastalıklarla ilişkisi	19
2.4.1. Lösemi ve miRNA	23
2.5. <i>Mir-223</i> ve Hedef geni <i>SKIL</i>	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. GEREÇ	29
3.1.1. Hasta Grubu	29
3.1.2. T-ALL Hastalarına Ait Klinik Parametreler	30
3.1.3. Kontrol Grubu ve Hücre Serileri	31
3.1.4. Kimyasallar	31
3.1.5. Kantitatif PZR materyali.....	31
3.1.6. Gen Spesifik cDNA Sentez Materyali	32

3.1.7. Kullanılan Cihazlar	32
3.1.8. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	33
Etidyum Bromür	33
3.2. YÖNTEMLER.....	34
3.2.1. Kontrol ve Hasta Hücrelerinin Eldesi.....	34
3.2.1.1. Timus Dokusundan Timosit Ayırıştırılması.....	34
3.2.1.2. Lökosit izolasyonu	34
3.2.2. RNA izolasyonu ve Kalite tayini	35
3.2.3. Hedef MiRNA Seçilmesi	37
3.2.4. Gen Spesifik cDNA sentezi ve Gerçek Zamanlı Kantitasyon	38
3.2.4.1. Stem-loop RT Polimeraz Zincir Reaksiyonu	38
3.2.4.2. Stem-Loop RT-Primer Dizayını.....	39
3.2.4.3. “Stem-loop” RT ile Gen Spesifik cDNA Sentezi	41
3.2.4.4. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	41
3.2.5. Hücre Kültürü	44
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. T-ALL hastalarında <i>mir-223</i> gen anlatımı düzeyleri.....	46
4.2. T ve B ALL hücre serilerinde <i>mir-223</i> gen anlatımı düzeyleri	47
4.3. B-ALL Hastalarında <i>mir-223</i> miRNA Anlatımı	50
4.4. T ve B ALL Hastalarında <i>mir-223</i> Anlatım Seviyelerinin Kıyaslanması	50
4.5. T-ALL Hastalarında <i>SKIL</i> ve <i>miR-223</i> anlatımlarının kıyaslanması.....	51
4.6. <i>Mir-223</i> Bulgularının T-ALL hastalarının klinik özellikleri ile ilişkisi	53
4.7. <i>Mir-223</i> Bulgularının Hasta Sağ kalımları Üzerine Etkileri.....	56
5. TARTIŞMA	60
KAYNAKLAR	655
FORMLAR	77
ETİK KURUL KARARI	800
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.1

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Lösemi Sınıflandırması	9
Tablo 2-2: Küçük RNA ların Sınıflandırılması	12
Tablo 2-3: MiRNA ve İlişkili Olduğu Hastalıklar	20
Tablo 2-4: Onkogen veya Tümörebaskılayıcı miRNAlar ve Muhtemel Hedef Genleri .	22
Tablo 2-5: Lösemi Oluşumunda Yer Alan MiRNAlar	24
Tablo 2-6: Olgun <i>mir-223</i> Dizisi ve Hedef mRNA'sına Bağlanma Bölgesi	27
Tablo 3-1: T-ALL Hastalarında EGIL Sınıflandırma Kriterleri	29
Tablo 3-2: T-ALL Hastalarına Ait Klinik Parametreler	30
Tablo 3-3: cDNA Sentezi için Kullanılan Gen Spesifik Primer Dizileri.....	40
Tablo 3-4: Gen Spesifik cDNA Sentezinde Kullanılan Reaksiyon Karışımı	41
Tablo 3-5: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR de kullanılan Primer ve Prob Dizileri	43
Tablo 3-6: Eş Zamanlı Kantitatif PZR de Kullanılan Karışım	44
Tablo 4-1: Cox Analizi Değişken Tablosu I.....	58
Tablo 4-2: Cox Analizi Değişken Tablosu II.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Normal Hematopoezde miRNAların Rolü	4
Şekil 2-2: Timusta T Hücre Farklılaşması	6
Şekil 2-3: MiRNAların T Hücre Farklılaşmasındaki Rolü	7
Şekil 2-4: Biogeneziye göre küçük RNAların sınıflandırılması	13
Şekil 2-5: RNA susturucularının domain organizasyonu	14
Şekil 2-6: MiRNA ve hedef mRNA eşleşme bölgesi	16
Şekil 2-7: MiRNA'nın Hedef Genlerini Düzenlemesi	16
Şekil 2-8: MiRNA Biogenezi	18
Şekil 2-9: Hematopoezin Farklı Basamaklarında Yer Alan miRNAlar	25
Şekil 2-10: <i>Mir-223</i> ün Kromozomal Lokasyonu.....	26
Şekil 2-11: <i>SKIL</i> Geninin Öngörülen Hedef miRNAları.....	27
Şekil 3-1: Bioanalizörde MiRNA Görüntülenmesi	36
Şekil 3-2: Jelde RNA Alt Ünitelerinin Görüntülenmesi.....	36
Şekil 3-3: Veri Tabanlarından <i>SKIL</i> Geni Hedef miRNAlarının Belirlenmesi	37
Şekil 3-4: Stem Loop PCR ile cDNA Yapılması ardından Gerçek Zamanlı PZR ile miRNA Kantitasyonu	39
Şekil 3-5: UPL proba Kantitatif Eş Zamanlı PZR Prensibi.....	42
Şekil 4-1: <i>mir-223</i> ün T-ALL Hastalarında mRNA Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi.....	46
Şekil 4-2: Hücre Serilerinde ve Kontrollerde <i>mir-223</i> Anlatımı	47
Şekil 4-3: <i>mir-223</i> ün T-ALL Hastalarında ve T hücre Serilerinde Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi	48
Şekil 4-4: <i>mir-223</i> ün B-ALL Hastalarında Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi	49
Şekil 4-5: <i>mir-223</i> ün B-ALL Hastalarında Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi	50
Şekil 4-6: <i>mir-223</i> ün B ve T ALL Hastalarında Anlatımlarının Kıyaslanması.....	51
Şekil 4-7: T-ALL Hastalarında <i>mir-223</i> ve <i>SnoN/SKIL</i> Genlerinin Anlatımlarının Şematize Olarak Kıyaslanması	52
Şekil 4-8: Hasta Klinik Bulguları ve <i>mir-223</i> Anlatımlarının Karşılaştırması I.....	53

Şekil 4-9: Hasta Klinik Bulguları ve mir-223 Anlatımlarının Karşılaştırması II	54
Şekil 4-10: Hasta Klinik Bulguları ve mir-223 Anlatımlarının Karşılaştırması III	55
Şekil 4-11: Kaplan Meier Sağ Kalım Analizi Genel Sağ Kalım	56
Şekil 4-12: Kaplan Meier Sağ Kalım Analizi Relapssız Sağ Kalım.....	56
Şekil 4-13: Cox Regresyon Analizinde Elde Edilen Genel Sağ Kalım Eğrisi.....	57
Şekil 4-14: Cox Regresyon Analizinde Elde Edilen Relapssız Sağ Kalım Eğrisi.....	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

T-ALL	T hücreli akut lenfoblastik lösemi
B-ALL	B hücreli akut lenfoblastik lösemi
miRNA	Mikro RNA
siRNA	Küçük interfere RNA
3'UTR	3' transle edilmemiş bölge
RISC	RNA aracılı susturucu kompleks
AGO	Argonat proteinleri
TGF β	Transforme edici büyüme faktörü
mRNA	Mesajcı RNA
HSC	Hematopoietik kök hücre
CLP	Ortak lenfoid öncüller
CMP	Ortak miyeloid öncüller
MPP	Çok potansiyelli öncüller
NK	Doğal öldürücüler
YF	Yazılım faktörü
THR	T hücre reseptörü
ÇP	Çift pozitifli evre
TP	Tek pozitifli evre
ÇN	Çift negatifli evre
OTP	Olgunlaşmamış tek pozitifli evre
Stem Loop RT PZR	Stem Loop ters transkriptazlı polimeraz zincir reaksiyonu
UPL	Evrensel prob kütüphanesi
BÇ	Baz çifti

EGIL	Avrupa lösemileri immünolojik olarak sınıflandırma grubu
RNA	Ribo nükleik asit
PBS	Fosfat Salin Çözeltisi
B-KLL	B hücreli kronik lenfoblastik lösemi
MSS	Merkezi sinir sistemi

ÖZET

Öztunç, C. (2012). T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemili Hastalarda mikroRNA(miRNA) Anlatımının Tespiti. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi.İstanbul.

Mikro RNAlar (miRNA), 19-23 nükleotid uzunluğunda küçük, fonksiyonel protein kodlamayan, tek iplikli RNA'lardır. Apoptoz, farklılaşma ve proliferasyon vb pek çok hücreyel yolakta görev alırlar. Yapılan araştırmalarda miRNAlardaki mutasyon veya gen anlatımı seviyesi değişimleri kanseri de içine alan birçok hastalığın süreci ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bilinen miRNAların %50'sinden fazlasının tümör oluşumuna onkogen ya da tümör baskılayıcı genleri hedefleyerek katkıda bulunabildikleri gösterilmiştir. Çalışmamızda bu veriler doğrultusunda T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) tanısı almış hastalarda (n=42) Transforme Edici Büyüme Faktör β (TGF β) yolağı üyelerinden *SKIL* genini hedefleyen *mir-223* anlatımı, Stem Loop Revers Transkriptaz-Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir reaksiyonu yöntemi ile tespit edildi. Kontrol olarak kullanılan timositlere (n=3) kıyasla artmış *mir-223* anlatımı tespit edildi ($p=0.004$). Ayrıca *SKIL* geni anlatım profili ile *mir-223* gen anlatımı arasında ilişki araştırıldı. *mir-223* anlatımının T soyu hücrelerine özgün olup olmadığını tartışabilmek için B hücreli lösemi (B-ALL) hastalarında da bu mikroRNA'nın anlatımı tespit edildi (n=11). Sonuçta kontrol CD19+ periferik kan hücrelerine kıyasla B-ALL hastalarında anlatım azalmış bulundu ($p=0.012$). Bir başka deyişle *mir-223* aracılığıyla gerçekleştiği düşünülen düzenlemenin T- hücrelerine ve T-ALL hastalarına özgü olduğu görüldü.

T-ALL, lösemiler arasında ağır seyri olan, tedaviye dirençli ve hastalığın takip edilebileceği özgün belirteçlerin henüz bulunamadığı bir hastalık grubudur. Elde edilen bulguların hastalığın patogenizinin aydınlatılmasına yardımcı olması, tedavisinde ise hastalığa özgün yeni biyobelirteçler olarak kullanılabilmesini amaçlamaktayız.

Anahtar Kelimeler : MikroRNA, T-ALL, *mir-223*, stem loop

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 19607

ABSTRACT

Öztunc, C. (2012). Detection of microRNA (miRNA) Expression in Patients with T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis, Istanbul.

MicroRNAs (miRNAs) are small, single stranded, non-coding RNAs of 19–25 nucleotide length. MicroRNAs play a crucial role in fundamental processes such as apoptosis, differentiation and proliferation. Several publications have showed that changes in microRNA expression profile or mutations in miRNAs have association with various cancer types. Also 50% of miRNAs contribute tumorigenesis by targeting tumor suppressor genes or oncogenes. According to all these findings, we analysed the *mir-223* expression levels, targeting *SKIL* gene which is a member of the transforming growth factor β signaling pathway (TGF β), by Stem Loop-Reverse Transcriptase-Real Time Polymerase Chain Reaction (PCR) method in patients with pediatric T cell leukemia (T-ALL) (n=42). When results were compared with control cells (thymocytes, (n=3)) we found significant up-regulation (p=0.004) in *mir-223* expression levels. Besides, we analysed the correlation between *mir-223* expression profiles and downregulated *SKIL* gene expression profiles. On the other hand to be sure about whether *mir-223* over expression is specific to T lineage or not, we also analysed *mir-223* expression levels in B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) patients (n=11), down-regulation was also observed in B-ALL patients compared to control CD19+ cells (p=0.012). Here we provided significant findings that, the rearrangement due to *mir-223* is T-ALL or T lineage specific.

T-ALL has a poor prognosis, resistance to treatment protocols and there are not any specific biomarkers for patient follow up yet. By our results, we aimed to identify new, more specific biomarkers for the follow-up and treatment stages of T-ALL patients. These findings may help to understand the mechanism underlying the leukemia pathogenesis more clearly.

Key Words: MicroRNA, T-ALL, *mir-223*, Stem-Loop

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No:19607

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler, köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid ve myeloid lösemi olarak iki gruba ayrılır. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL); çocukluk çağı kanserleri arasında en yaygın olup, yüksek çeşitlilikte epigenetik (metilasyon vb.) ve genetik (mutasyon, gen anlatım değişiklikleri, translokasyon vb.) bozulmaları içeren, olgunlaşmamış T ve B lenfositlerinin artmış proliferasyonunun görüldüğü bir kanser çeşididir. (19,20).

T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), tek bir T hücresinden kökenlenip, hücrelerin klonal çoğalması ve birikmesi sonucunda normal hematopoezin baskılanması ile karakterize, malin bir hastalıktır. Çocukluk çağı ALL vakalarının %10-15, yetişkin ALL vakaların ise %25' ini oluşturmaktadır (21). Pediatrik T-hücreli akut lenfoblastik lösemi hasta gurubu lösemiler içinde en kötü seyreden, tedaviye dirençli ve patogenezi ve prognozu ile ilişkilendirilmiş çok sayıda mutasyon (genom, kromozom, gen mutasyonları) tanımlanmış olmasına rağmen hastaların takip edilebileceği özgün moleküler belirteçlerin halen bulunmadığı bir hastalık gurubudur.

Son yıllara kadar, yapılan çalışmalar, tümör oluşumu ve gelişiminden birincil derecede sorumlu bölgelerin genomdaki protein kodlayan genler olduğunu düşündürmekteydi. "Mikro RNA" (miRNA) ların keşfi ile birlikte protein kodlamayan miRNA anomalilerin de, kanser dahil birçok hastalığın patogeneziye katkıda buldukları gösterilmiştir (1,2). Ayrıca bu güne kadar haritalanan miRNA lar, özellikle çeşitli kanserlerle ilişkilendirilen kromozomların fragil bölgelerinde bulunmaktadır.

Mikro RNAlar (miRNA), 19-23 nükleotid uzunluğunda küçük, fonksiyonel protein kodlamayan, tek iplikli RNA'lardır. Genellikle mesajcı RNA (mRNA) gen anlatımı üzerinde, yani posttranskripsiyonel aşamada, negatif düzenleyici etki gösterirler. Özellikle memelilerde, miRNAların oldukça fazla çeşit ve sayıda geni kontrol ettiği öngörülmektedir ve seviyelerindeki herhangi bir değişim hücre metabolizması ve homeostazında dengesizliklere neden olup, hastalık oluşumuna öncülük edebilmektedir. Sonuç olarak miRNA da oluşabilecek herhangi tür mutasyon, anlatım bozukluğu veya fonksiyon kaybı nörodejeneratif hastalıklardan diyabete, kalp hastalıklarından kansere kadar çok geniş spektrumlu pek çok hastalık türlerinden biri ile sonuçlanabilir.

Ayrıca miRNA gen anlatımlarının sağlıklı ve patolojik dokularda farklı olarak görüntülenmesi farklı hastalıkların oluşum süreçleri hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilmesine olanak sağlamıştır. Dokular arasında ve hastalığın farklı aşamalarında farklı miRNA anlatımları gözlemlenmiştir. Bu durum özgün miRNAları özgün hastalıklarla ve hastalık aşamalarıyla bağdaştırılmasına yardımcı olmuştur. (14)

Bu tez çalışması kapsamında T-ALL patogenezinde gen anlatımının bozulması sonucunda katkısı olduğu bilinen tümör baskılayıcı özellikteki *SNO_n/SKIL* genini hedefleyen ayrıca hematopoietik hücre gelişimi sırasında progenitör hücrelerin T lenfositleri ve myeloid seriye yönelmesinde etkili olduğu bilinen *mir-223* anlatımı pediatrik T-ALL hastalarında (n=42) Stem-Loop Ters Transkriptaz ve takiben Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile incelendi.

Çalışma sonucunda T-ALL gelişiminde *SNO_n/SKIL* geninin düzenlenmesinde rol alabileceği düşünülen *mir-223* etkilerinin hastaların klinik parametreleri (relaps, cinsiyet, tanı lökosit sayısı, translokasyon varlığı vs.) arasındaki ilişkisinin araştırılması yanısıra T-ALL hastalığının patogenezinde katkına bulunan yeni biomoleküllerin saptanması hedeflendi.

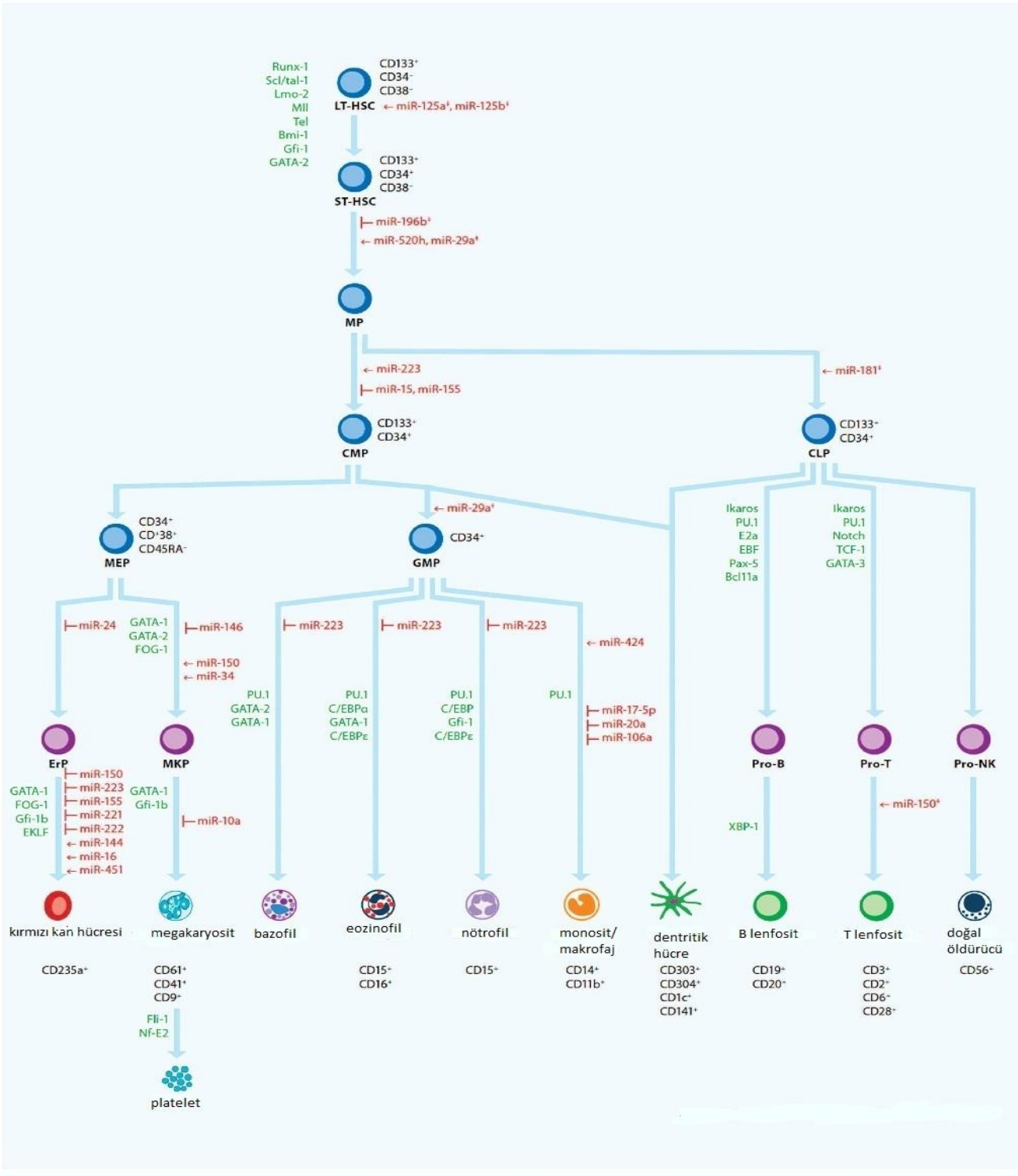
2.GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Hematopoez

Hematopoez, kan hücrelerinin oluşum/olgunlaşma süreci olarak tanımlanabilir. Hematopoetik gelişimin ilk aşaması bir çok hücre tipine farklılaşma yeteneğine sahip kök hücrelerin, myeloid veya lenfoid öncül hücrelere farklılaşmasıyla gerçekleşir. Hematopoetik öncül hücrelerden olgun kan hücrelerinin gelişimi, yani hematopoez; fetal dönemin erken evresinde vitellüs kesesinde (4-6 hafta) 6.haftadan sonra ise karaciğer ve dalakta (8.hafta) gerçekleşir. Kemik iliğinde üretim 4-5. aydan itibaren başlar. Doğumdan sonra ise, bütün hematopoetik fonksiyonlar sadece kemik iliğinde gerçekleşir. Karaciğer ve dalakta hiç bir hematopoetik aktivite kalmaz (1).

İmmün sistem hücrelerini de içeren kanın bütün şekilli elemanları, kemik iliğindeki pluripotent özellikteki hematopoetik hücrelerden köken alırlar (2).

Pluripotent özellikteki bu hematopoetik kök hücreler kendi kendini yenileme (“self-renewal”) ve farklılaşma yeteneğine sahip uzun dönem (“long-term HSC”) hematopoetik kök hücrelerdir. Erken farklılaşma safhasında uzun dönem hematopoetik kök hücreler kendi kendini yenileyebilme özelliklerini kaybederek öncelikle kısa-dönem hematopoetik kök hücrelere (“short-term HSC”) daha sonrada hızlıca multipotent öncül hücrelere (MPP) farklılaşırlar. Multipotent öncül hücreler çok kısıtlı veya hiç kendi kendini yenileyebilme özelliği olmayan sadece lenfoid veya myeloid seri hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olan özellikteki hücrelerdir (3). Farklılaşan bu lenfoid öncül hücrelerden (“common lymphoid progenitor” = CLP) B ve T lenfositleri ile doğal öldürücü (“natural killer”=NK) hücreler oluşurken, myeloid öncül hücrelerden (“common myeloid progenitor”=CMP) eritroid, megakaryositik ve granülositik/monositik (GM) hücreleri oluşur (4) (Şekil 2-1).



Şekil 0-1: Normal Hematopozde miRNAların Rolü (15)

Hematopietik hücrelerin farklı gelişim basamaklarında farklı miRNAlar yer almaktadır.

LT-HSC: Uzun dönem hematopetik kök hücre ; STHSC: Kısa dönem hematopoetik kök hücre ; MP: multipotent öncül; CMP: Ortak myeloid öncül; CLP: ortak lenfoid öncül; MEP: megakaryosit-eritrosit öncül; GMP: Granülosit-makrofaj öncül; ErP: eritrosit öncül; MKP: Megakaryosit öncül; NK: Doğal öldürücü

Kendi kendini yenileyebilme ve farklılaşma özelliğine sahip kök hücrelerin olgun hücrelere farklılaşması epigenetik düzenlemeler ve yazılım faktörleri (YF) gibi iç etkenler ile sitokinler, hormonlar veya adezyon molekülleri gibi çevresel faktörlerin kontrolü altında olur. (5)

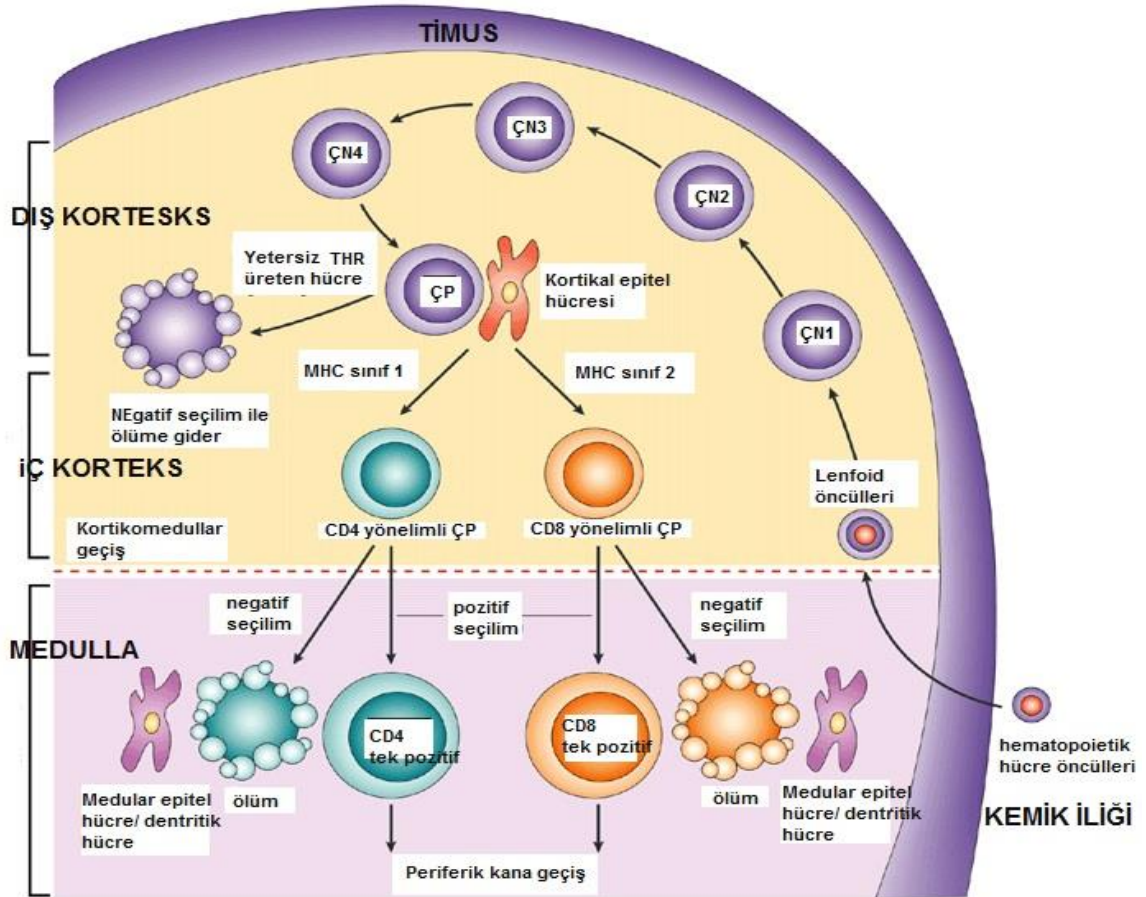
Özellikle YF nin hematopoezi düzenlemesi üzerine yapılan çalışmalarda miRNA ve YFlerin birlikte hematopoetik farklılaşma esnasında gen anlatımlarını düzenlediği bilinmektedir. Hücre soyu (T lenfositleri, B lenfositleri vs..) özgün YF leri hematopoietik farklılaşmayı yöneten, pek çok hücre kaderini belirleyen kararlarda gen anlatımının düzenleyen anahtar moleküllerdir ve miRNA ların öncül hedefleridirler. *Mir-223*, *mir-181*, *mir150*, *mir-155* ve *mir-142* nin özellikle hematopoietik dokuda anlatımının görüldüğü gözlemlenmiştir (6,14).

MiRNA ların erken dönem puliripotent özellikteki hematopoietik kök hücrelerdeki rolü düşük hücre sayılarından elde edilen düşük konsantrasyonlu miRNA lar yüzünden henüz tam anlaşılmasına karşın primitif Lin-CD34+CD38-CD90+CD45RA-, CD34+CD38-, CD133+ ve murine hematopoietik kök hücrelerde analiz edilebilmiş ve her bir basamakta farklı miRNA ların anlatımları tespit edilmiştir (7,8,9,10,11). *Mir-125b* Lin-CD34+CD38- CD90+CD45RA- hücrelerde aşırı aktifken, *mir-29a/b* CD34+CD38- hücrelerde düşük anlatıma sahiptir (9). Dolayısıyla hematopoietik kök hücrelerin de farklı gelişim basamaklarında farklı miRNA lar aktif olmaktadır. Başka bir örnek, *mir-150* olgun T ve B lenfositlerinde aktif iken, öncüllerinde inaktiftir (12). Ayrıca farklı hücre soylarında (T-B lenfositleri, miyeloid seri.. vb) olgunlaşmaya başlayan hematopoietik hücreler de özgün miRNA gen anlatımı profillerine bakılarak ayırt edilebilir. Örneğin *mir-451* eritrosit seride yüksek anlatım gösterirken, *mir-223* T lenfoid seride yüksek anlatım göstermektedir (13).

2.1.1. Normal T Hücresi Gelişimi

T hücreleri, kemik iliği veya karaciğerde puliripotent prekürsör hücrelerden köken alırlar. Puliripotent hücreler buradan T hücre farklılaşmasının gerçekleşeceği yer olan timusa göç ederler (16). Timositlerin gelişim basamağı sırasıyla; CD4-CD8- (çift negatif-ÇN), CD4+CD3- (olgunlaşmamış tek pozitif-OTP), CD4+CD8+(çift pozitif-ÇP), CD4+CD3+ veya CD8+CD3+ (tek pozitif-TP) olarak adlandırılmaktadır. CD3

pozitifliği fonksiyonel T hücre reseptör geninin (THR) hücre yüzeyinden sunulabilmesi için gereklidir (17). (Şekil 2-2)

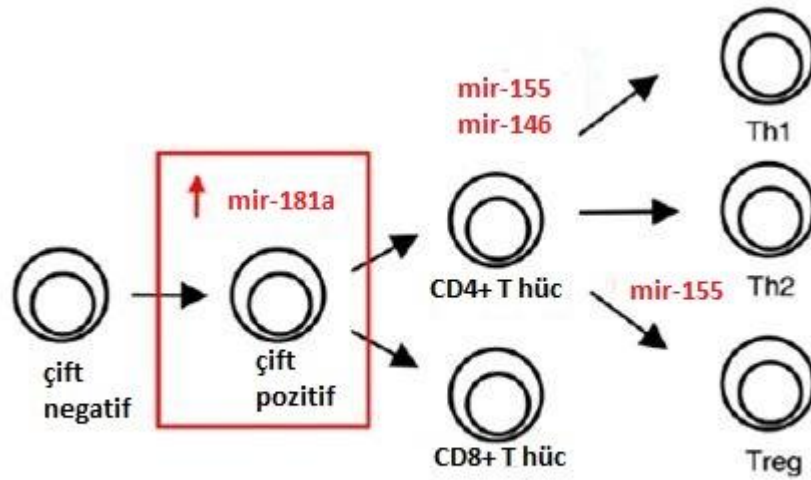


Şekil 0-2: Timusta T Hücre Farklılaşması (18)

T hücre gelişim, farklılaşması ve hayat döngüsü sitokinler, adhezyon molekülleri ve timik stroma tarafından sağlanan sinyaller ile gerçekleşir ve bunun tüm amacı fonksiyonel THR ye sahip olgun T hücre oluşumunun sağlanmasıdır (19). Oluşan THR fonksiyonel ise hücreler ÇP aşamasında MHC proteinleri ile reaksiyona girer (pozitif seleksiyon) fonksiyonel değil ise negatif seleksiyon gerçekleşir. Gelişen timositlerin %95i bu yolla seçilerek apoptoza uğrar. Hayatta kalanlar CD4+ (yardımcı

hücreler) veya CD8+ (sitotoksik hücreler) olarak olgunlaşıp periferik kana geçerler (20,21).

THR kompleksinin oluşması sürecinde de mikroRNAların önemli rolleri bulunmaktadır. *Mir-181a* nın in yüksek gen anlatımı T hücrelerinin ÇP aşamasında MHC ye karşı afinitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra mir-181a anlatımı baskılandığında ÇP hücrelerin MHC ye karşı afiniteleri anlamlı bir şekilde azalmakta ve pozitif-negetif seleksiyon engellenmektedir (22). *Mir-150* B-T matur hücrelerde yüksek anlatım gösterirken bu hücrelerin öncüllerinde anlatımı yoktur. Ayrıca *mir-150* nin aşırı anlatımı kök hücre progenitörlerini, olgun B hücrelerinin dolaşımdaki miktarını azaltmasına yöneltirken, T hücreleri ve miyeloid seri üzerine çok az etkisi vardır (23). *Mir-146* sadece CD4+ olgun T hücrelerinin TH1 e dönüşümünde etkilidir (23). *Mir-155* in ise T yardımcı hücre farklılaşmasında sitokin salınımını kontrol ederek katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir (24,25) (Şekil 2-3).



Şekil 0-3: MiRNA ların T Hücre Farklılaşmasındaki Rolü (26)

2.2. Kanser Tanımı

Kanser, somatik hücrelerin genetik bir hastalığıdır. Tümör karyotiplerinin çoğu sayısal ve yapısal birçok genetik bozukluk taşır. Gelişmiş ülkelerde, ortalama olarak beş kişiden biri kanser nedeni ile hayatını kaybetmektedir. Kanser hücreleri, çok hücreli organizmaların kuruluş ve gelişimi ile ilgili en temel davranış kurallarını bozarak gelişim gösterirler. Aşırı bölünme (kontrol dışı çoğalma) sonucu tümör oluşturma (neoplazm), normalde başka hücrelere ait olan bölgelere yayılım (metastaz) ve o bölgelerde klonlaşma (malin) kanser hücrelerinin en belirgin özelliklerindedir (27). Kanserler, köken aldıkları doku ya da hücre tipine göre sınıflandırılırlar. Epitel hücrelerden kökenlenen tümörler karsinoma, bağ dokusu ya da kas dokusundan kökenlenen tümörler sarkoma olarak adlandırılır. Her iki sınıflandırmaya da uymayan ve hematopoetik hücrelerden kökenlenen kanserler ise lösemi adını alırlar (27).

Kanserin oluşumunda yer alan pek çok çeşit mutasyon vardır. Genel olarak sorumlu olan onkogen, tümör baskılayıcı gen ve miRNA lardaki değişimler ile kromozomal translokasyonlar sonucu oluşan kimerik proteinlerdir. Bu değişimlere ek olarak kanser oluşumunu tetikleyen süreçler arasında, hücre döngüsünde yer alan proteinler, mitotik bölünmeyi kontrol eden düzenleyiciler, programlanmış hücre ölümünde yer alan hücresel elemanlar ile mutasyonları tespit edip onaran mekanizmalar yer almaktadır. Bu değişimler çoğunlukla somatik olmasına rağmen eşey hücrelerinde gerçekleşen mutasyonlar ailese/kalıtsal özellik gösterebilir (27,28).

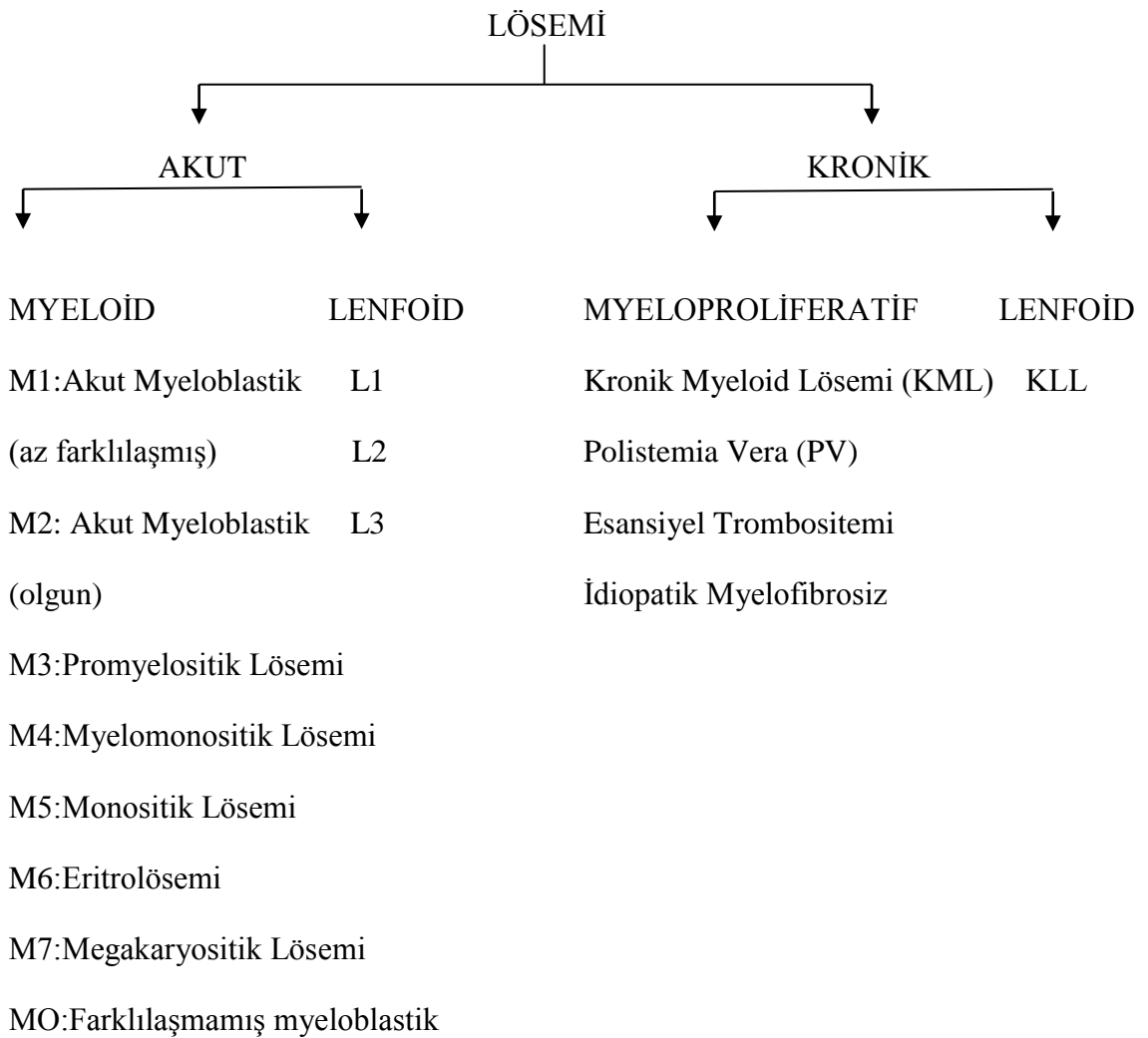
Tek bir genetik değişiklik nadiren tümör oluşumuyla (kansinogenez) sonuçlanır. Çoğunlukla tümörler değişmiş bir hücrenin, sitogenetik veya moleküler değişimlerin eklendiği ikincil veya üçüncül klonları içerir. Mutajen çevresel faktörlerin (radyasyon, kimyasallar vs..) de etkileri ile kansinogenez süreci hızlanmaktadır (27).

2.2.1. Lösemi Tanımı ve Sınıflandırılması

Hematopoetik hücrelerden kökenlenen kanserler ise lösemi adını alırlar (27). Lösemiler, hematopoetik hücrelerin habis transformasyonu sonucu gelişen, heterojen, neoplastik hastalıklar grubudur. Morfolojik yönden, hastalığa tutulan hücre dizisinin tipine göre (myeloid ya da lenfoid) ve proliferen olan kan hücresinin genç ya da olgunlaşmış olmasına göre (akut ya da kronik) sınıflanırlar (29).

Akut ve Kronik lösemiler, olgunlaşmamış blast hücrelerinin kemik iliğindeki normal hematopoetik elemanlarının yerlerini almalarıyla ortaya çıkar, myeloid ya da lenfoid hücre serilerinden kökenlenirler (29) (tablo2-1). Akut lösemilerde lösemik hücrelerin kemik iliğini aşırı istilası sonucu normal kan hücrelerinin yapımı engellenir ve buna bağlı olarak anemi, enfeksiyon, kanamalar meydana gelir.

Tablo 2-1: Lösemi Sınıflandırması (30)



2.1.2. T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) olgunlaşmamış T hücrelerinin malin bir hastalığıdır. Pediatrik vakaların %15 i , yetişkinlerin ise %25 inde görülür. Yüksek blast sayısı, mediastinal ve merkezi sinir sistemi tutulumları gözlenir. T-ALL timustan köken alsada tedavi edilmediği sürece çevresel kan yoluyla dalak ve karaciğer başta olmak üzere diğer organlara hızla yayılır ve ölümle sonuçlanır (31).

T hücrelerinin malin ransformasyonundan hücre döngüsü, farklılaşma, proliferasyon genlerinde genetik (translokasyon, gen anlatımı değişimleri, mutasyon vb.) ve epigenetik (metilasyon vb.) değişimler sorumlu tutulmaktadır. Uzun zamandır sıkça THR üzerine odaklanılan çalışmalar artık hızla gelişmekte ve T-ALL ye neden olduğu düşünülen ve hastalarda en sık rastlanan mekanizmalar 3 ana grup altında incelenmektedir; Onkogen yüksek anlatımları, gen mutasyonları ve yeniden düzenlenmeler (32). T-ALL de en sık gözlenen anomalilik *TLX1/ TLX3* , *TAL1* ve LMO1 onkogenlerinin aşırı anlatımlarıdır (33,34). Ayrıca *FBXW7* mutasyonları (%8-16) ile yakından ilişkili olan NOTCH1 mutasyonları (%50) T-ALL de en sık rastlanan mutasyonlar arasındadır (35,36). Bunun yanı sıra *JAK1*(%3-20), *WT1*(%8-13) ve *PTEN*(%8) mutasyonları da T-ALL hastalarında sık gözlenmektedir (37,38,39). *NUP214/ABL1*, *EML/ABL1*, *CALM/AF10* yeniden düzenlenmeleri ve *MYB*, *CDKN2A* ve *RBI* delesyonları da hastalarda dökümente edilen değişimler arasındadır. (40,41,42,43,44,45). HOX ailesi mutasyonları da T-ALL patogenezinde önemli bir yere sahiptir (43,44).

Onkogenik fakörler dışında miRNA ların da T-ALL oluşumuna katkısı olduğu bilinmektedir. Bu küçük moleküller ya onkogenik, ya da tümör baskılayıcı özellik göstererek lökomogeneze katkıda bulunurlar (46). Örneğin t(13;14)(q32;q11) translokasyonunun hedefi olan mir-17-92 kümesinin elemanı mir-19b T-ALL ile ilişkilendirilmiştir (47,48). Yine başka bir çalışmada T-ALL ile ilişkilendirilmiş *PTEN*, *BIM*, *NF1*, *FBXW7*, *IKZF1* ve *PHF6* gibi aktivasyonları bozulmuş tümör baskılayıcı genleri hedefleyen, *mir-223* başta olmak üzere *miR-19b*, *miR-20a/93*, *miR-26a*, *miR-92* nin T-ALL patogenezinde aşırı anlatımları ile katkıda buldukları tespit edilmiştir (49).

Daha önce yapılan çalışmalarda fareye transplante edilen *mir-125b* anlatımı tetiklenmiş fetal karaciğer hücreleri T-ALL geliştirmesi ile, farelerde *mir-125b* nin onkogenik aktivitesi kanıtlanmış ve lökomogeneze önemli bir yeri olduğu

ispatlanmıştır. Onun dışında BCR-ABL translokasyonu pozitif lösemi hücreleri, mir-125b aşırı anlatımında lösemi geliştirildiği gözlemlenmiştir. Bu durum BCR-ABL füzyon geninin onkogenik aktivasyonunu sergilemesine *mir-125b* nin olanak sağladığını göstermektedir (50).

Diğer bir örnek, fareye *Notch1* ve *mir-19b* nin beraber tetiklendiği hematopoietik hücreler transfekte edildiğinde bu hücrelerin , sadece *Notch1* transfekte edilen fareye göre daha hızlı bir şekilde T-ALL geliştirdiği gösterilmiştir (51).

Mir-196b ve komşu genlerinden *HOXA9* ve *HOXA10* ailesinin eş zamanlı anlatımının da T-ALL yi aktiflediği gösterilmiştir (52).

2.3. Küçük ribonükleik asitler (“small RNA”)

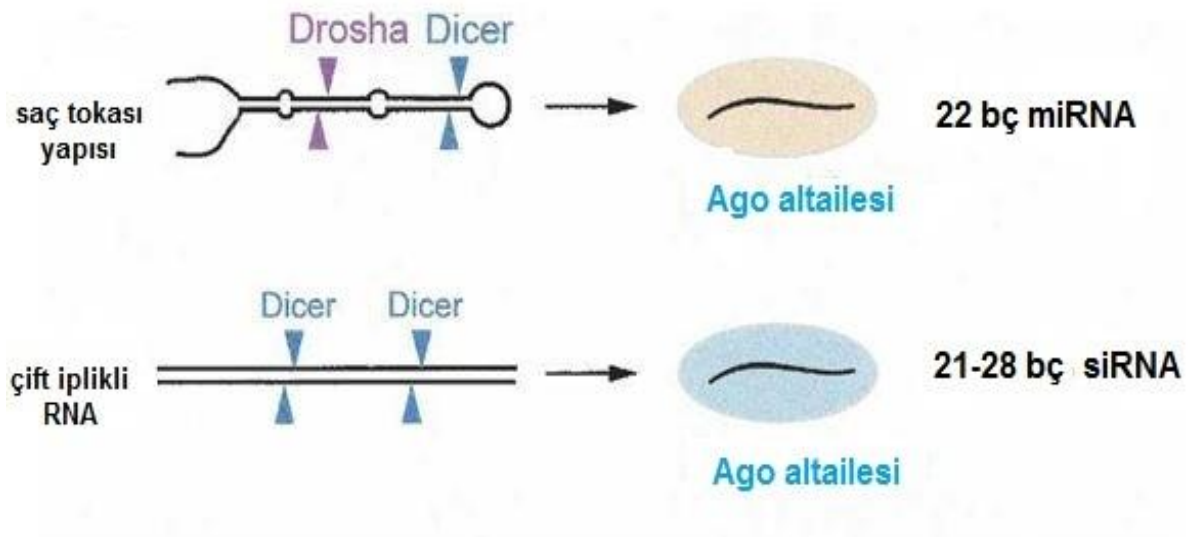
RNAi; ‘‘RNA interferans’’ başka bir deyişle ‘‘RNA susturulması’’ mRNA düzeyinde gen anlatımının kapatılması anlamına gelmektedir. RNA interferans (RNAi) yolağının ilk keşfi *Caenorhabditis elegans* (C.elegans) da genlerin RNAi tarafından susturulmasıyla gerçekleşmiştir; lin-4 protein kodlamasada, kısa bir RNA transkripti kodlanmaktadır ve mRNA (lin14) yı 3’ transle edilmemiş kısmına (3’UTR) bağlanarak inhibe edebilme özelliğine sahiptir (53). Daha sonra nematodla sınırlı kalmayıp *Drosophila melanogaster* , *Trypanosoma* ve omurgalılarda da RNAi yolağı araştırılmaya devam edilmiştir ve daha da genişleyerek küçük RNaların, genler üzerindeki düzenleyici mekanizmalarının keşfi mantar, bitki ve insan gibi daha gelişmiş canlılarda genetik çalışmalarının odak noktası haline gelmeye başlamıştır (54,55) Önceden küçük RNaların (tRNA, rRNA vb) sadece genetik kodun DNA dan proteine çevrilmesinde aracılık yaptıkları bilinmekteydi (56). Fakat yapılan bu araştırmalar sonucunda küçük RNaların; özgün dizi bağlanması ile mRNA degradasyonunda, translasyon baskılanmasında (siRNA, miRNA vb), heterokromatin yapının formasyonunda ve eşey kökenli genomda transpozon susturulmasında da (rasiRNA, piRNA vb), DNA eliminasyonunda (scnRNA) işlevlerinin olduğu keşfedilmiştir. Bu işlevleri ile küçük RNalar apoptozdan, hücre bölünmesine, hücre farklılaşmasına, kanserden bir çok hastalığa kadar pek çok biyolojik ve patofizyolojik basamaklara katkıları bulunmaktadır (57,58,59) (tablo2-2).

Tablo 0-2: Küçük RNA ların Sınıflandırılması (56,60)

Sınıf	Uzunluk	İşlev
mikroRNA (miRNA)	19-25	Translasyonel baskılama
“Small interfering” RNA (Sirna)	19-21	Hedef mRNA yıkımı
“Trans-acting” SiRNA(Tasirna)	21-22	mRNA yıkımı
“Small-scan” RNA (ScnRNA)	~28	DNA eliminasyonu
“Repeat-Associated” RNA (rasiRNA)	24-27	Transpozon kontrolü, transkripsiyonel baskılama
“Piwi-interactin” RNA(piRNA)	26-31	Germ hücrelerinde transpozon kontrolü
“Tiny-noncoding” RNA(tncRNA)	~20	Tam bilinmiyor.
“Small modulatory” RNA (SmRNA)	~20	Tam bilinmiyor.
Transfer RNA (tRNA)	75-95	3 nükleotitli yapının amino aside çevrilmesi / translasyon
“Guide” RNA (gRNA)		RNA editing
“Small cajal body” RNA (scaRNA)		RNA modifikasyonu

İnsan genomunun %1-2'si protein kodlamasına rağmen, %98 kadarı protein kodlamaya da transkribe olmaktadır ve küçük RNAlar bu %98lik kısım içerisindeyler. Küçük RNAlar ya protein kodlayan genlerin intronlarından yada protein kodlamayan genlerin intron veya ekzonlarından transkribe olurlar (61,62).

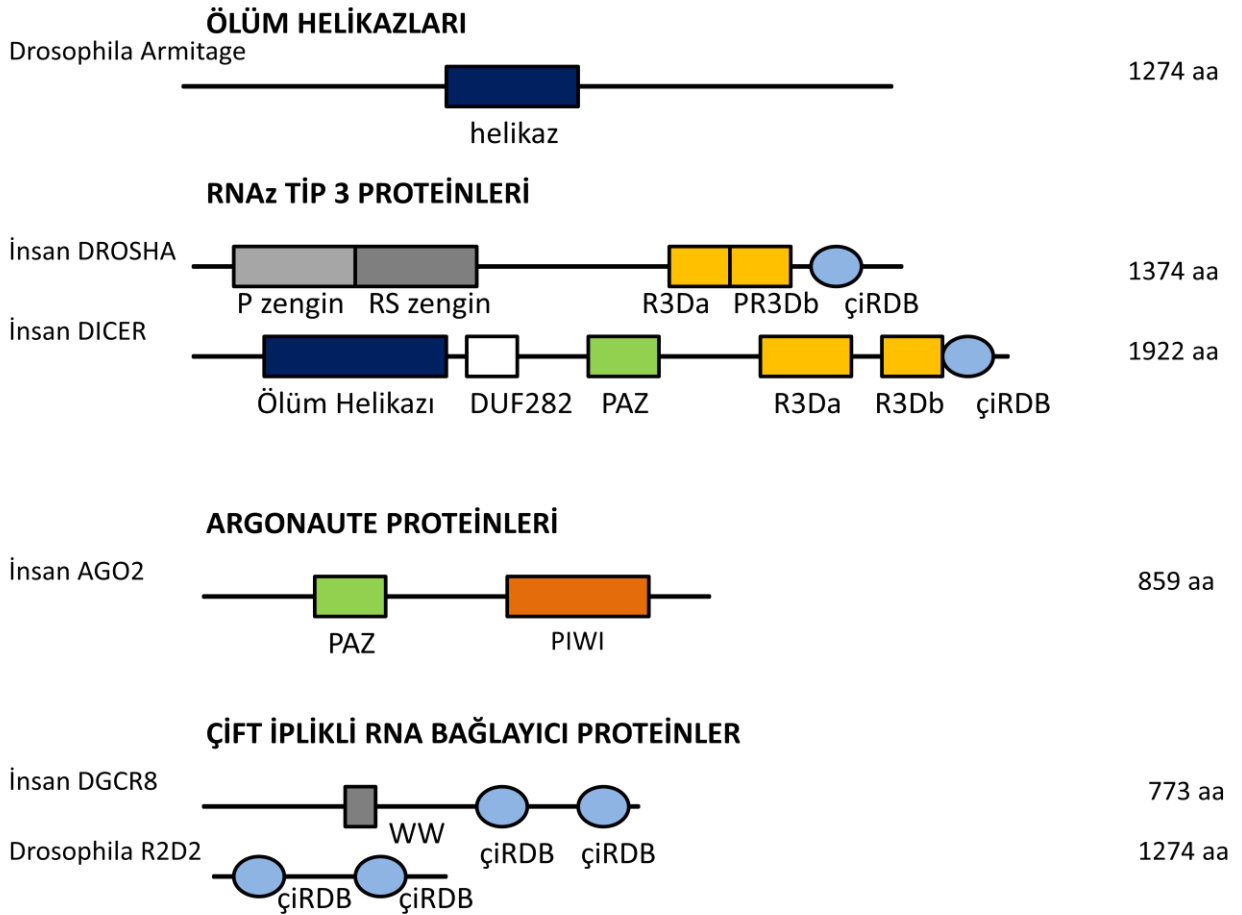
Bu ortalama 19-31nt uzunluğundaki küçük RNA lar 2 ana sınıf altında toplanabilirler; miRNalar ve siRNalar. Mirnalar saç tokası yapısındaki çift iplikli RNA dan, siRNalar ise uzun çift iplikli RNA lardan ökaryotlarda korunmuş faktörler tarafından kırılma işlemleri gerçekleştirilerek olgun hallerini alırlar (şekil2-4).



Şekil 0-4: Biogenezine göre küçük RNAların sınıflandırılması (63)

RNAz III küçük RNA yolağındaki en önemli faktörlerden biridir. 2 alt sınıfa ayrılır; Dicer (sınıf III) ve Drosha (sınıf II). Dicer çift iplikli öncül küçük RNayı 21-22ntlik parçalara kırpar. Drosha ise miRNA'nın olgunlaşması öncülündeki için saçtokası yapısını serbest bırakır. R iki enziminde çift iplikli RNA bağlama kısımları bulunmaktadır (60). Daha sonra olgunlaşmış miRNA veya siRNalar, RNA-induced silencing complex (RISC) ile etkileşime girerek onları Argonaute proteinlerinin (AGO

proteinleri) mRNA yıkımı yapacakları bölgeye doğru yönlendirirler. AGO proteinleri yakın bir zaman önce mRNA yıkımından sorumlu protein olarak gösterilmiştir ve ökaryotlar arasında yüksek derecede korunmuştur. AGO proteinleri PAZ ve PIWI kısımlarından oluşur, PAZ ile etkileşime giren siRNA veya miRNAları mRNA susturmasına veya yıkımına yönlendirir (64,65,66,67,68) Eğer hedef mRNA ve küçük RNA arasındaki baz eşleşmesi birebirse mRNA yıkımı ile sonuçlanır fakat eşleşme daha düşük baz sayısında olursa mRNA susturulması ile sonuçlanır. Küçük RNA yolağında çift iplikli RNA ya bağlanan miRNA işlenmesini başlatıcı kofaktörler olarak tanımlanmış başka proteinlerde bulunmuştur; DGCR8. Ayrıca RNA helikazlarında bu yolda işlev aldığı tahmin edilmektedir (69,70) (şekil2-5).

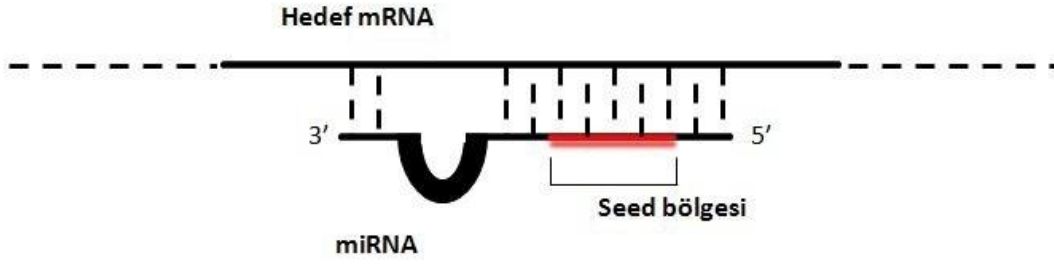


Şekil 0-5: RNA susturucularının domain organizasyonu (60)

SiRNA'nın alttipleri arasında; RasiRNA, tasiRNA, scnRNA dan bulunmaktadır (71). Onun dışında henüz işlevleri tam keşfedilememiş tncRNA ve smRNA ayrıca guide gRNA, small cajal body scaRNAda küçük RNalar rasındadır (72).

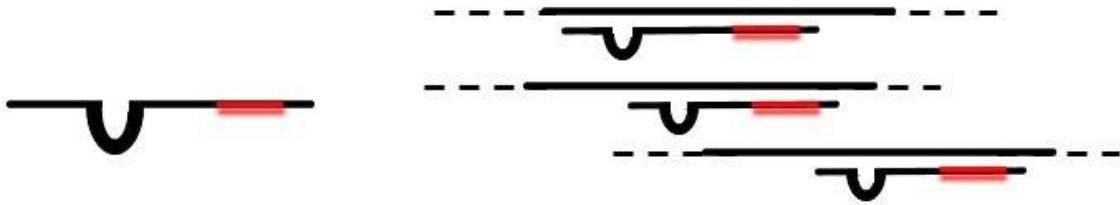
2.3.1. MiRNA

MikroRNA lar ~22nt uzunluğunda, tek zincirli, endojen kaynaklı, gen anlatımını hedef mRNA ile baz eşleşmesi yaparak post-transkripsiyonel aşamada düzenleyen kısa RNA dizileridir. İnsan genomunun %1-4ü miRNA kodlamaktadır ve %10-30 protein kodlayan gen miRNalar tarafından düzenlendiği öngörülmektedir (73). MiRna ların C.elegans ta 1993te ilk keşiflerinden bu yana ökaryotlarda yüzlercesi daha tanımlanmış ve hücre farklılaşması, büyümesi, gelişmesi immün reaksiyonlar, stres adaptasyonu gibi fizyolojik; kanser, kalp hastalıkları gibi patofizyolojik olaylarla ilişkilendirilmişlerdir. Tek bir miRNA nın birden fazla gen hedefi olabildiği gibi bir mRNA yı hedefleyen birden fazla miRNA da bulunabilmektedir (74,75,76). MiRNA'nın yapısında 5' ucunda bulunan ve hedef mRNA ile eşleşmesini sağlayan kısımlar bulunmaktadır ve tanıma-eşleşme bölgeleri (seed region) olarak adlandırılır (şekil2-6). Post-transkripsiyonel aşamada gen regülasyonunun düzenleyebilmeleri için miRNA'nın seed regionları ile; hedef mRNA nın 3'UTR ındaki miRNA tanıyıcı kısımlara (MTK), 2-9 bazlık eşleşme yapması gerekmektedir. Bu seed bölgelerinin eş olduğu miRNAların ise aynı mRNAları hedeflediği bilinmektedir (şekil2-7). Fakat miRNAlar seed bölgeleri dışında tüm ~22ntlik dizi olarak evrimsel olarak korunduklarından ötürü aslında tüm dizi halinde hedef mRNA özgünlüğüne katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (77,78).

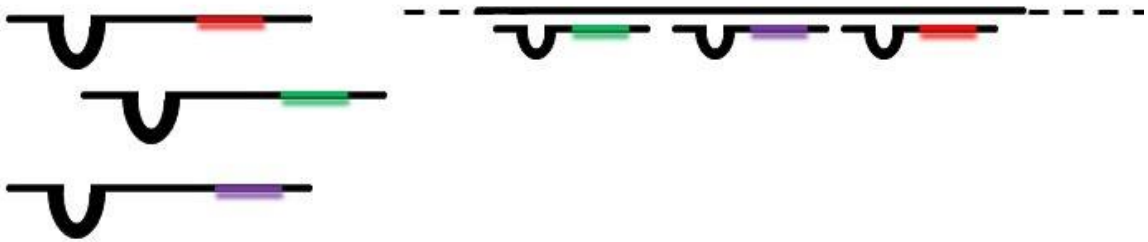


Şekil 0-6: MiRNA ve hedef mRNA eşleşme bölgesi (79)

Bir miRNA nın birden fazla mRNA hedefi olabilir

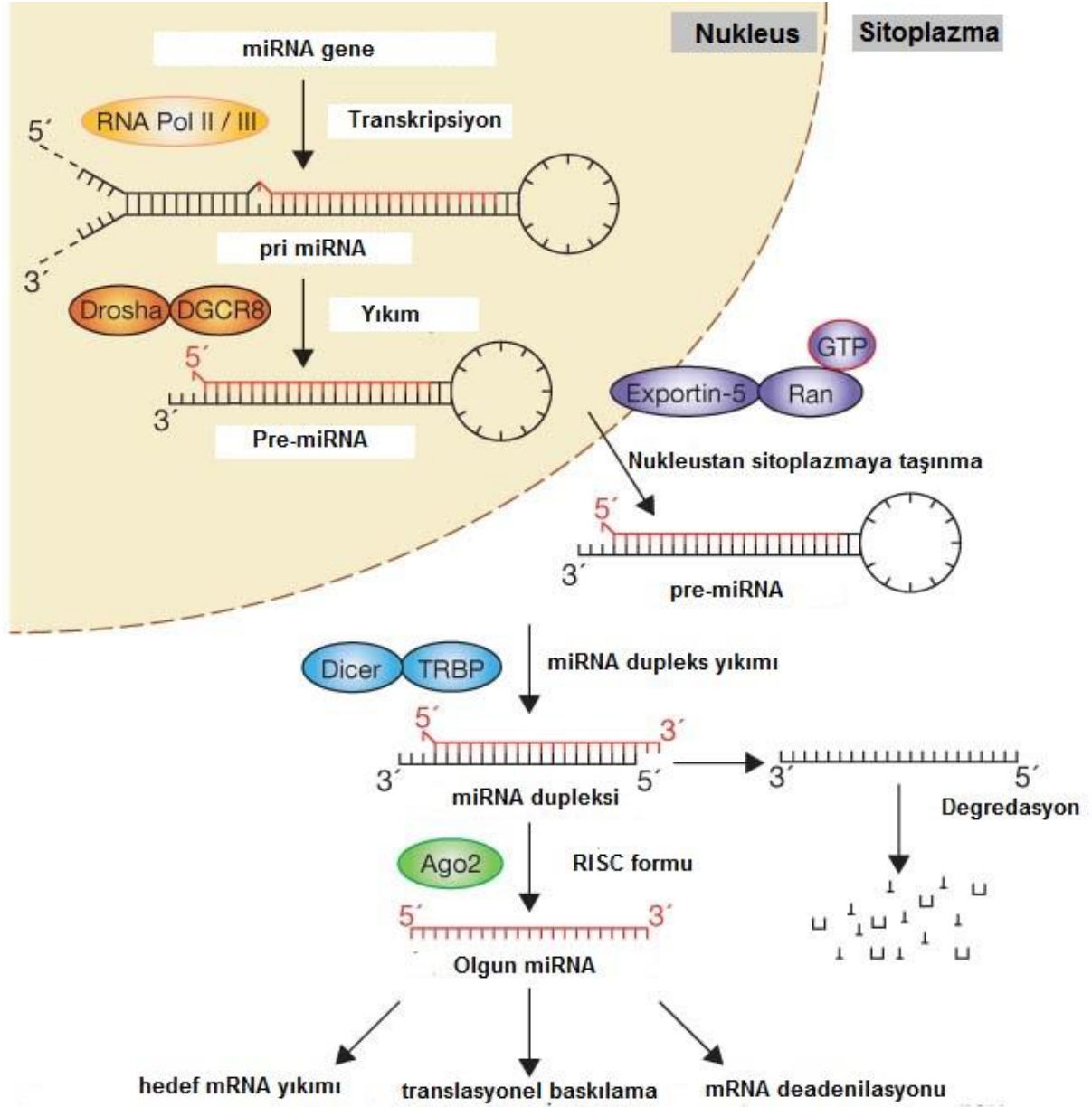


Birden fazla miRNA aynı mRNA yı hedefleyebilir



Şekil 0-7: MiRNAnın Hedef Genlerini Düzenlemesi (79)

Yapılan genomik lokasyon analizlerine göre miRNAlar intronik yada ekzonik lokasyonlardan RNA polimeraz II tarafından uzun öncül çift iplikli transkriptleri (pri-mirna) oluşturulur. Stem-Loop yapısındaki bu öncül transkript yaklaşık 2kb uzunluğunda olup matur miRNA dizisini içinde taşımaktadır. Daha sonra DROSHA ile etkileşime giren pri-mirnalara daha kısa bir form olan 70-100 nükleotitlik loop yapılı, çift iplikli prekürsör mirna lara (pre-mirna) dönüşürler (80). Pre-miRNAlar diğer kodlanmayan RNA lar gibi karyoferin ailesinden nuklear transport reseptör 5 (EXPORTIN5) tarafından nukleustan sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmada RNAz III enzim ailesinden DICER loop yapısını pre-mirna dan keserek uzaklaştırır ve yaklaşık 22nt lik olgun çift iplikli miRNA yapısı oluşur. DICER ve DROSHA kırpma işlemlerini gerçekleştirirken “çift iplikli RNA ya bağlanan proteinler”den yardım alırlar (81). İki iplikten “guide strand” olarak adlandırılan iplik, multiprotein yapıdaki RNA susturucu kompleks (RISC) ile hedef mRNA susturulması için etkileşime girer. “Passenger strand” olarak adlandırılan diğer iplik uzaklaştırılır ve yıkıma yönlendirilir (82). Hangi ipliğin aktif olacağının seçimini etkileyen faktörler arasında termodinamik stabilitesi ve stem-loop pozisyonu vardır. Fakat yine de bazı durumlarda her iki ipliğin birden aktif olup farklı mRNA ları hedefledikleri gözlemlenmiştir (83,84,85) (şekil2-8).



Şekil 0-8: MiRNA Biogenezi (86)

MiRNA olgunlaşmasından sonra, genellikle miRNaya bağlı gen susması; hedef mRNA'nın 3' UTR'si ile tam olmayan baz eşleşmesi yapan miRNA'nın translasyonunun baskılanması ve mRNA degradasyonu ile sonuçlanır (87). miRNAlar, hedef mRNA'nın 5'UTR bölgesi, açık okuma çerçevesi (ORF) ya da doğrudan DNA dizisi ile etkileşime girerek transkripsiyonu düzenlemektedir. Ayrıca, miRNAların gen anlatımını baskılayıcı özelliklerinin yanısıra bazen özel durumlarda/şartlarda mir-369-3'ün tumor

nekrosiz faktör α (TNF α) nın anlatımını arttırıcı özelliğinde olduğu gibi onkogenik rolü de olduğu keşfedilmiştir (88).

2.4. miRNA ve Hastalıklarla ilişkisi

miRNAlar embriyonik gelişimden, hücre proliferasyonuna ve büyümesine , doku farklılaşmasından, apoptoza kadar pek çok hücreyel yolakta rol oynayan anahtar moleküllerdir (89). MiRNA da oluşabilecek herhangi tür mutasyon, disregulasyon veya işlev bozukluğu nörodejeneratif hastalıklardan diabete, kalp hastalıklarından kansere kadar çok geniş spektrumlu pek çok hastalık türlerinden biri ile sonuçlanabilir. Şimdiye kadar miRNA deregülasyonu ile ilişkilendirilmiş 100den fazla hastalık tanımlanmıştır (90,91) (tablo2-3).

Tablo 0-3: MiRNA ve İlişkili Olduğu Hastalıklar (92,93,94,95,96,97)

Hastalık	MiRNA	Hedef Gen
Kardiyovaskular		
Miyokardiyal İnfarksiyon	mir-1/mir-499-5p	HDCA4
Felç	mir-221	PTEN
Kanser		
Akciğer	Mir-210	HIF1
Karaciğer	Mir-224	SMAD4
Meme	Mir-195	BCL2
KLL	Mir-15a/ mir-16-1	FGFR1/PIC3CA
Prostat	Mir-141	ZEB1/ZEB2
Nörolojik		
Alzheimer	Mir-107	BACE1
Huntington	Mir-9	REST
Sepsis		
	Mir-146a	NFkB
Alerji		
Romatoid Artrit	Mir-146a	TRAF6/IRAK1
Diabet		
	Mir-28-3p	Bilinmiyor

Bunun yanı sıra miRNA biyogenezi ve fonksiyonel olarak hedef mRNA'yı etkileme aşamasında gerekli olan komponentlerdeki (enzimler, zincire bağlanan proteinler vs..) değişimler de Fragil-X ve Di-George sendromu ve kanser gibi pek çok hastalık türü ile ilişkilendirilmiştir (90,91).

miRNA ve hastalık ilişkisinin en çok araştırma konusu olan kanserde, ilk olarak miRNA rolü olduğu B hücreli kronik lösemide (B-KLL) %50'den fazla hastada saptanan 13q14 delesyonun sonucu mir-15 ve mir-16 deregulasyonu ile keşfedilmiştir (98). İlginç olarak yumurtalık, meme, melanoma ve lösemi gibi pek çok kanser tipi ile ilişkilendirilmiş miRNAların çoğu kromozomların kırılma, viral entegrasyonun

olduğu, heterozigosite kaybının olduğu ve kanserle ilişkilendirilen b6lgelerinde lokalize olmaktadır (99,100).

MiRNAlar kanser gelişiminden invazyonuna ve metastaza kadar pek çok kanser oluşma aşamasında rol almaktadırlar. Kanser de miRNA rolü hedeflediği genin onkogen yada t6m6r baskılayıcı gen olmasına g6re değişmektedir. Pek çok t6m6r baskılayıcı 6zellikte mirRNA tanımlanmıştır. 6rneğin mir-143 ve mir-145 in pek çok kanser tipinde anlatımlarının azaldığı belirlenmiştir, prostat ve kolorektal kanserde bu miRNA'ların anlatımlarının arttırılması sonucu t6m6r b6y6mesinin azaldığı g6zlemlenmiştir (101,102). DNA onarımı, h6cre d6ng6s6 ve apoptoz gibi h6cresel fonksiyonlarda yer alan ve p53 tarafından transkripsiyonu d6zenlenen mir-34a anlatımı pankreas kanserinde azalmıştır (103). Diğer bir yandan çok sayıda onkogenik miRNA da tanımlanmıştır. 6rneğin mir-21 ve mir-155 çeşitli kanser tiplerinde anlatımları artmış olarak tespit edilen miRNAlardır ve onkogenezi tetiklerler (104,105)(tablo2-4).

Tablo 0-4: Onkogen veya Tümör baskılayıcı miRNAlar ve Muhtemel Hedef Genleri
(106, 107,108,109,110,111, 112)

miRNA	Fonksiyonu	Muhtemel hedef geni	Kanser tipi
Mir-15/16	TS	BCL-2	KLL
Mir-17-92	onko	PTEN TCF1 CTGF	Lenfoma Mide Pankreas
Mir 17-5p	TS	E2F1	B hücreli Lenfoma
Let-7	TS	RAS	Küçük hücreli akciğer Oral
Mir-14	TS	ERK5	Meme Kolon
Mir-124	TS	CDK6	Meme Medullablastoma
Mir-221/mir-222	onko	KIT P27 P53	Papiller Tiroid Glioblastoma Lösemi
Mir-21	onko	PTEN	Prostat Kolorektal Böbrek
Mir-29b	TS	TCL1	KLL
Mir-155	Onko	BIC	B Hücreli Lenfoma
Mir-127	TS	BCL-6	Kolon Lenfoma Pankreas
Mir-34	TS	BCL-2	Meme Meme Akciğer Kolorektal

Ayrıca genlerden RNA polimeraz II tarafından miRNA transkribe edilirken pekçok epigenetik mekanizmanın devreye girdiği bilinmektedir. Bunun sonucu olarak miRNAlardaki genetik değişimlerin yanısıra epigenetik değişimlerinde pek çok hastalığa yol açtığı bilinmektedir. Örneğin mesane kanserinde mir-127 gen anlatımındaki azalma promotor hipermetilasyonundan kaynaklanmaktadır (113). Mir-193a, mir-342, mir-137 da pek çok insan kanser tipinde hipermetile olarak bulunmuştur (114,115). Ayrıca miRNA promotorleri histon modifikasyonları ile de gelişim ve patogenez esnasında regüle edilmektedir. Mir-1 in akciğer kanserinde düşük anlatım göstermesi histon deasetilaz tarafından muamele edilince eski haline dönmesi, mir-1 promotorünün tümörlü dokuda asetile olduğunu ispatlamaktadır (116).

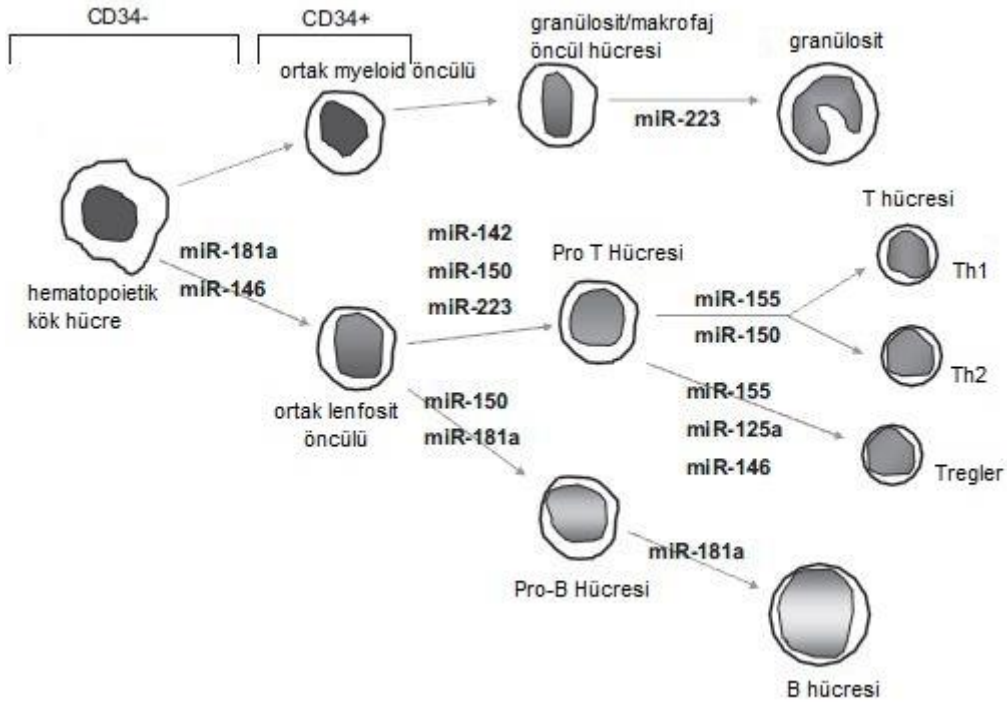
2.4.1. Lösemi ve miRNA

Daha önceki lösemi çalışmalarında miRNA gen anlatım profillerinin malin ve normal hücrelerde farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca miRNA anlatım profillerinin lösemi alt tipleri arasında da ayırım yapılmasına yardımcı olabileceği gösterilmiştir (117). Örneğin, 2007 nin sonlarına doğru en sık rastalanan çocukluk çağı kanserlerinden Akut Lenfoblastik Löseminin (ALL), Akut Myeloid Lösemiden (AML) %95'lik bir oranla miRNA anlatım profillerine bakılarak ayırt edilebileceği gösterilmiştir (118) (tablo2-5).

Tablo 0-5: Lösemi Oluşumunda Yer Alan MiRNAlar (119,120,121,122,123,123,124,126)

Mirna	Gen anlatımı durumu	Lösemi Tipi
Mir-10a	Anlatım azalması	KML
Mir-15a/mir16-1	Anlatım azalması	KLL
Mir-17-92 kümesi	Anlatım artışı	KML
Mir 29/ mir 181b	Anlatım azalması	KLL
Mir-106b	Anlatım artışı	KLL
Mir-107	Anlatım artışı	APL
Mir-124a	Anlatım azalması	AML
Mir-125b-1	Anlatım artması	ALL
Mir-126	Anlatım artması	AML
Mir-128	Anlatım artması	ALL
Mir-148a	Anlatım azalması	AML(60 yaşından genç)
Mir-155	Anlatım artması	AML(FLT3 mutasyonlu)
Mir-181a	Anlatım azalması	AML(60 yaşından genç)
Mir-191/mir-199	Anlatım artması	AML t(11q23)
Mir-204	Anlatım azalması	AML
Mir-221/mir-222	Anlatım artması	AML
Mir-223	Anlatım azalması	AML t(8;21)

Bütün bunların yanısıra hematopoezde hücrelerin farklı gelişim aşamalarında farklı miRNAların aktif olduğu bilinmekte ve miRNA profillerine bakılarak hücreler gelişim basamaklarına göre sınıflandırılabilir. Hematopietik sistem spesifik miRNAlar örneğin; *mir-155*, *mir-223*, *mir-181*, *mir-146*, *mir-150* ve *mir-21* dir. Bu miRNAlar granüositlerden, T ve B hücrelerine kadar farklı hematopietik sistem hücrelerinin gelişim evrelerinde yer almaktadırlar ve hastalık patogenezi anlatımlarının bozulması sonucu hedef genlerinin de düzenlenmelerini bozmalarıyla katkıda buldukları bilinmektedir (127) (şekil 2-9).

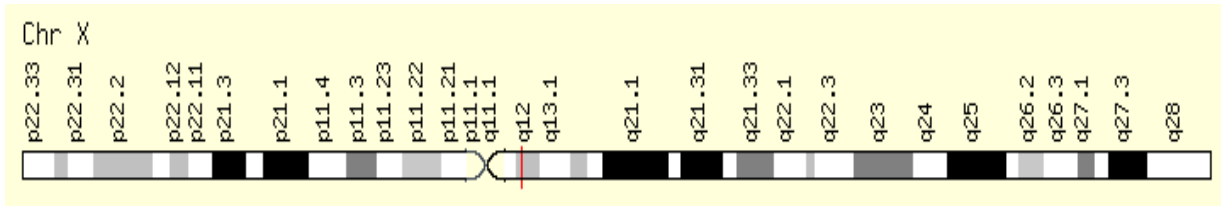


Şekil 0-9: Hematopoezin Farklı Basamaklarında Yer Alan miRNAlar (127)

Lösemi kemik iliğinden henüz olgunlaşmamış hücrelerin klonal olarak çoğaldığı, tedaviye dirençli ve hastaların takip edilebileceği özgün moleküler belirteçlerin halen bulunmadığı bir hastalık gurubudur. Bu küçük moleküllerin, ‘miRNA’ ların gen regülasyonundaki etkilerinin ve doku spesifik miRNA’ların keşfi ile yeni biyobelirteç olma potansiyelleri yüksektir. Ayrıca terapötik olarak onkogenik miRNAlara anit-mir-oligoları ile susturularak veya tümör süpressör miRNAlar doğrudan öncül veya malign kök hücrelere ya da vücuda enjekte edilerek klasik lösemi tedavileriyle kombine olarak kullanılması hedeflenmektedir (128).

2.5. *Mir-223* ve Hedef geni *SKIL*

Mir-223, hematopoietik sistem spesifik bir miRNA olup löseminin yanısıra anlatımının bozulması romatoid artrit, sepsis, hepatik iskemi, tip2 diyabet, yumurtalık, mide ve karaciğer kanseri ile de ilişkilendirilmiştir (129,130,131,132). *Mir-223*, X kromozomunun q12 kolunda lokalizedir (şekil2-10).



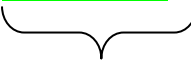
Şekil 0-10: *Mir-223* ün Kromozomal Lokasyonu (www.genecards.org)

Mir-223 ün aşırı anlatımı hematopoietik kök hücrelerin %30-50 oranında B hücreleri yada myeloid seri yönünde değil, T hücreleri yönünde farklılaşmasını sağlamaktadır(127). T-ALL patogenezi katkıda bulunan miRNAlar arasında *mir-223*ün en yüksek anlatıma sahip olduğu ve onkogenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. (49).*Mir-223* ün 150den fazla hedef geni bulunmaktadır. Anlatımının bozulması lösemi patogenezi ile ilişkilendirilmiş hücre bölünmesi, farklılaşması ve apoptozda önemli rol oynayan TGF β yolağı üyelerinden olan *SKIL* geni *mir-223* hedef genleri arasındadır (şekil2-11). *Mir-223*, yedi baz çiftlik (bç) bir “seed” uzunluğu ile *SKIL* geninin 3’UTR bölgesi ile baz eşleşmesi yapmaktadır (tablo2-6).

Gene Name	MicroRNA	StemLoop ID	miRanda	miRDB	miRWalk	PICTAR4	RNA22	Targetscan	SUM
SKIL	hsa-miR-216a	hsa-mir-216a	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-140-3p	hsa-mir-140	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-548c-3p	hsa-mir-548c	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-1283	hsa-mir-1283-1	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-223	hsa-mir-223	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-1298	hsa-mir-1298	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-548l	hsa-mir-548l	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-577	hsa-mir-577	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-548d-3p	hsa-mir-548d-1	1	0	1	0	0	1	3
SKIL	hsa-miR-32	hsa-mir-32	1	0	1	0	0	1	3

Şekil 0-11: SKIL Geninin Öngörülen Hedef miRNAları (www.umm.uni-heidelberg.de)

Tablo 0-6: Olgun *mir-223* Dizisi ve Hedef mRNAsına Bağlanma Bölgesi

<p>Olgun <i>mir-223</i> dizisi;</p> <p>5'-UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA-3'</p> <p></p> <p>*"Seed" bölgesi (7bç) SKIL 3'UTRına özgün</p>

TGF β yolağı hematopoietik hücreler için güçlü bir antiproliferatif ve farklılaşma sinyalidir. Normal T hücre olgunlaşma basamaklarında da yolağın aktif olduğu bilinmektedir. Yüksek yolak aktivasyonuna maruz kalan T hücrelerinin lösemik transformasyon gösterebileceği bildirilmiştir (133).

Ski protein ailesinden olan SKIL, onkogenik özellikte, TGF β yolağının baskılayıcısı görevinde olan ve regülasyon bozukluğu yolağın aşırı aktivasyonu ile sonuçlanan TGF β yolağının anahtar bir genidir. Aşırı aktivasyonu tavuk embriyo fibroblastlarında onkogenik transformasyonla sonuçlanmıştır (134). Ayrıca meme ve

akciğer kanseri hücre hatlarında *SKIL* in shRNA ile susturulması sonucunda tümör büyümesi inhibe olmuştur (135). *SKIL* geni bir onkogen olarak bulunmuş olsa da genin tümör baskılayıcı olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (136,137). *SKIL* geninin tamamen kaybının letal olduğu fakat *SKIL* +/- farelerde yaşamlarının 4. ayında B ve T hücreli lenfomalar geliştirdikleri bulunmuştur (137).

Bugün için literatürde *SKIL* geni ile ilgili çalışmalar çok az sayıdadır. Lösemi ile ilişkileri açısından hiçbir bilgi yoktur. TGF β yolağı üyesi olan *SKIL* geninin tümörogeneze katkısı gen anlatımını bozan mekanizmaların tespiti ile daha iyi anlaşılabilir. Gen mutasyonları, epigenetik mekanizmalar dışında miRNAların da gen anlatımı düzenlenmesi üzerindeki etkileri bilinmektedir. miRNAlardan kaynaklı gen anlatımı düzenlenmesi bozulmaları lösemi dahil pek çok kanser tipi ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada;

- i. Öncelikle daha önceki mikrodizilim analizlerimizde pediatrik T-ALL hastalarında anlatımının önemli derecede azalmış olduğu saptanan *SNO*/*SKIL* genini hedefleyen miRNA ların belirlenmesi amaçlanmıştır.
- ii. MiRNA analizleri sonucu, T hücre gelişiminde erken aşamalarında rol oynadığı bilinen hsa-*mir-223* seçilerek, bu miRNA ile ilgili araştırmalar yapılmıştır.
- iii. Hastalığı temsil eden hücre serileri ile T-ALL hastalarına ait primer tümör örneklerinde *Mir-223* gen anlatım düzeyleri araştırılmıştır.
- iv. Normal T-hücre gelişimini temsil eden ve timus dokusundan ayrıştırılmış timositlerde ve B-hücrelerini temsil eden CD19+ hücrelerde normal mir -223 gen anlatımı saptanmıştır.
- v. Hastalık modeli olarak T ve B hücreli akut lösemi hücre serilerinde, pediatrik T-ALL (n=42) ve pediatrik B-ALL (n=11) hastalarının primer tumor örneklerinde mir -223 gen anlatımları belirlenmiştir.
- vi. Hastaların *mir-223* anlatımı ile *SNO*/*SKIL* gen anlatımları karşılaştırılarak bu 2 genin ilişkisi gösterilmiştir
- vii. Hastaların klinik bulguları ile *mir-223* gen anlatımının korelasyonu irdelenmiştir.
- viii. Bu tez kapsamında yapılan araştırmalar ile *mir-223* geninin T-ALL patogenezindeki muhtemel rolünün araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.3. GEREÇ

3.3.1. Hasta Grubu

Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), Genetik Anabilim Dalı moleküler hematoloji laboratuvarına genetik tanı amacıyla başvuran çocukluk çağı (1-18 yaş arası) T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) hastalarından (n=52), tanı ve arşivleme sonrası artan kan/kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Çalışmaya dahil merkezler; İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi (n=10), Sağlık Bakanlığı Bakırköy Hastanesi (n=9), İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (n=8), Sağlık Bakanlığı Göztepe Hastanesi (n=6), Şişli Etfal Hastanesi (n=3), Kocaeli Üniversitesi Hastanesi (n=1) dir. Hastalar çalışmaya katılmadan önce bilgilendirilmiş ve çalışmanın kapsamını detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatılmıştır. Çalışma İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul tarafından 23.06.2011 tarihli ve 183 sayılı etik kurul onayı ile desteklenmiştir. İlgili merkezlerde akut lösemi tanısı almış hastaların takip ve tedavisinde Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) tedavi protokolü uygulanmıştır. Hastalara ait detaylı klinik bilgi tablo verilmiştir (Tablo 3-2).

Hastalar ileri analizler için immünofenotipik işaretlere dayalı EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias, Avrupa Lösemilerin İmmünolojik Olarak Sınıflandırılması Grubu) sınıflandırması kriterleri kullanılarak alt gruplara bölünmüştür (138) (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: T-ALL Hastalarında EGIL Sınıflandırma Kriterleri

T hücreli ALL (sitoplazmik/yüzey CD3+)	
Pro-T-ALL(T-I)	CD7+
Pre-T-ALL(T-II)	CD2+ ve/veya CD5+ ve/veya CD8+
Kortikal T-ALL(T-III)	CD1a+
Matür T-ALL(T-IV)	Yüzey CD3+, CD1a-

3.3.2. T-ALL Hastalarına Ait Klinik Parametreler

Tablo 3-2: T-ALL Hastalarına Ait Klinik Parametreler

Klinik Parametreler	Hasta Sayısı(n=42)
Cinsiyet	
Kadın	13(%31)
Erkek	29(%69)
Yaş (yıl)	
Medyan	9
0-10 arası(10dahil)	22(%52)
10-18 arası	18(%43)
Tanı Lökosit Sayısı (mm³)	
Medyan	117.780(min1.300-max603.000)
50<	14(%33)
50>	20(%48)
Bilinmeyen	8
EGIL Sınıflandırması	
TI	1(%2)
TII	5(%12)
TIII	14(%33)
TIV	15(%28)
Bilinmeyen	7
Remisyon (33.gün)	
Var	26(%61)
Yok	5(%12)
Bilinmeyen	11
Son Durum	
Ex	11(%26)
Sağ	22(%52)
Takip dışı	12
Organ Tutulumu	
Lenfadenopati	
Var	19(%45)
Yok	14(%33)
Bilinmeyen	9
Splenomegali	
Var	24(%57)
Yok	7(%16)
Bilinmeyen	11
Hepatomegali	
Var	18(%43)
Yok	13(%31)
Bilinmeyen	10
Merkezi Sinir Sistemi Tutulumu	
Var	7(%17)
Yok	25(%60)
Bilinmeyen	10

3.3.3. Kontrol Grubu ve Hücre Serileri

Kontrol grubu olarak T hücrelerinin gelişimlerini tamamladığı timus dokusu hücreleri kullanılmıştır. Kontrol hücreleri, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilimdalı'nda gerçekleştirilen kalp ameliyatlarında hastalardan ameliyat artığı olarak çıkartılan timus dokularından elde edilmiştir. Çalışma İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul tarafından 23.06.2011 tarihli ve 183 sayılı etik kurul kararı ile onaylanmıştır. Hastalar çalışmaya katılmadan önce onam formu ile çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve onayları alınmıştır..

Çalışmada ayrıca 5 farklı T-ALL hücre serisi (Cem, Molt4, Rpmi 8402, Jurkat, Dnd41) ve 2 farklı B-ALL(Reh, Nalm6) hücre serisi kontrol olarak kullanılmıştır.

Bunların yanında 11 B-ALL hastasına ait örnekler T-ALL ile karşılaştırma amacı ile kontrol grubu olarak değerlendirmeye alınmıştır.

3.3.4. Kimyasallar

Trizol	Invitrogen, İsviçre
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Etil Alkol	Merck, Almanya
Fikol	Biochron
Agaroz	Invitrogen, İsviçre
Kloroform	Merc
PBS	Ambresco
FCS	Biochron
DnaseI	Sigma, Almanya
RPMI1640	Biochron

3.3.5. Kantitatif PZR materyali

LC480 master mix	Roche, Almanya
UPL prob	Roche, Almanya
UPL primer	Roche, Almanya

96 kuyulu PZR tabakları

Roche, Almanya

3.3.6. Gen Spesifik cDNA Sentez Materyali

Gen spesifik primer	MBI Fermentas, Litvanya
Random Primer	Invitrogen, Almanya
10mM dNTP miks	Invitrogen, Almanya
RNaz inhibitör	Invitrogen, Almanya
5X RT buffer	MBI Fermentas, Litvanya
0.1M DTT	Invitrogen, Almanya
5X single strand Buffer	Invitrogen, Almanya
Superscript 2 Revers Transkriptaz (200U/ μ l)	Invitrogen, Almanya
Revers Transkriptaz	MBI Fermentas, Litvanya

3.3.7. Kullanılan Cihazlar

Otomatik pipetler (Glison, Eppendorf)
 Çeker ocak (Kermanlar)
 Otoklav (Kermanlar)
 Distile su cihazı (Millipore)
 Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Sanyo, Bosch, Heraeus Sepatech)
 Soğutmalı santrifüj (Eppendorf)
 Masa üstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)
 Işık mikroskobu (Olympus CX41)
 Jel görüntüleme sistemi (UVP)
 Eş zamanlı PZR cihazı (LightCycler 480, Roche)
 Vorteks (Kermanlar)
 Flow kabin (Thermo Scientific)
 Spektrofotometre (Nanodrop)
 VI-CELL cell viability analyzers (Beckman Coulter)

PZR cihazı (T100, Biorad)
Hassas Terazı (Shimadzu)
Elektroforez aleti (Stratagene)
Güç Kaynağı(Stratagene)
Bioanalizör (Agilent)

3.3.8. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Fosfat Solüsyon Salın- PBS (1X)

Her 100ml ddH₂O içine 1 tablet PBS atıldı, otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Tris-asetat EDTA-TAE (500 ml, 50X)

121 gr Tris baz, 28,5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml EDTA 0,5M ddH₂O ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Agaroz jel yükleme tamponu (50X)

10 ml steril ddH₂O içinde %0,25 Bromfenol mavisi, %30 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

Etidyum Bromür

Steril ddH₂O ile 10mg/ml olacak şekilde stok hazırlandı.

3.4. YÖNTEMLER

3.4.1. Kontrol ve Hasta Hücrelerinin Eldesi

3.4.1.1. Timus Dokusundan Timosit Ayırılması

Petri kabında besiyeri içine alınan timus dokusu bir bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı. Her parça metal süzgeç üzerine alındı, %5FCS'li PBS eklenerek bir şırınga yardımıyla ezildi. Bu işlem tüm hücreler timus dokusundan dışarı çıkana kadar sürdürüldü.(Normalde kırmızı olan timus dokusu beyaz bir renk alır.)

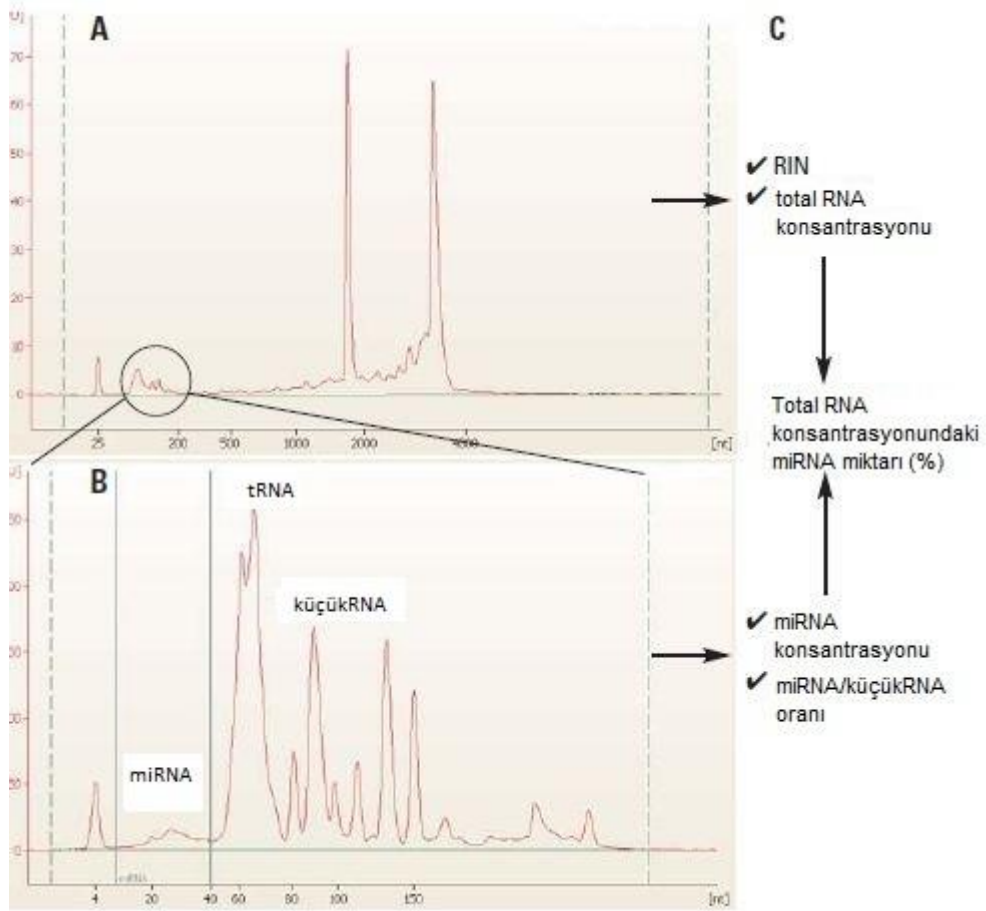
Elde edilen %5FCS'li PBS içinde solüsyon haldeki hücreler filtreden geçirilerek (tam parçalanmamış doku parçalarını tutmak için) falkonda biriktirildi. Timositler +4⁰C de 1570 rpm'de 5dk. Santrifuj edildi. Üstte kalan solüsyon atıldı. Hücrelerin üstüne 5000U/ml DnaseI eklenip 30-50ml e tamamlandı. Varsa hücre kümeleri uzaklaştırıldı. Tekrar +4C de 1570 rpm'de 5dk. Santrifuj edildi, üst kısım atıldı, 5000U/ml DnaseI eklendi. 20x10⁶ hücre RNA izolasyonu için trizole alındı. Kalan hücreler tüp başına 2x10⁹ hücre olacak şekilde gerekli miktarda FCS eklenerek donduruldu.

3.4.1.2.Lökosit izolasyonu

Fikol-histopak yöntemi kullanılarak mononükleer hücre izolasyonu yapılmıştır. Fikol ile ayırıştırma yöntemi yoğunluk gradientine dayanmaktadır. Pıhtılaşmamış kan veya kemik iliği örneği fosfat tampon çözeltisi ile (PBS) sulandırıldıktan sonra dikkatlice fikolun üzerine yayılır. 2060 rpm'de 15 dk. santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında tüpte 3 faz gözlemlenir. Örnekler; en altta sedimentasyona uğrayarak dibe çöken eritrositler ve yoğunlukları nedeniyle ayırıştırma solüsyonu olan fikolu geçebilen granüositler, orta fazda "buffy coat" adı verilen ve ayırıştırma fazının üstünde toplanan mononükleer hücreler (lenfosit, monosit, trombositler) en üst fazda ise plazma olacak şekilde ayrılırlar. Pastör pipeti ile yeni tübe toplanan mononükleer hücreler, trombositlerden uzaklaştırılmak için 2 defa PBS ile yıkanır. Elde edilen lökosit pelleti 1ml trizol solüsyonu içine alındı, kullanım zamanına kadar -80C de saklandı.

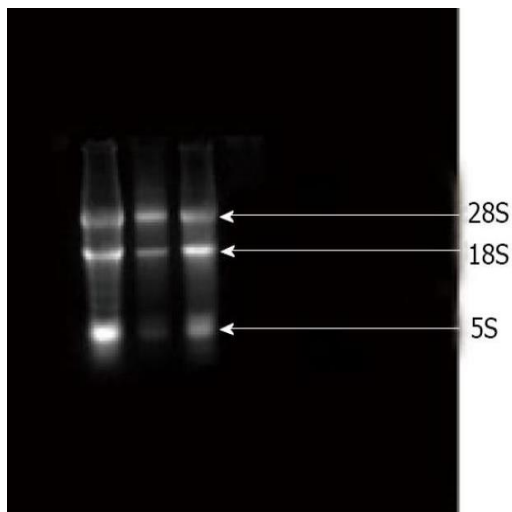
3.4.2. RNA izolasyonu ve Kalite tayini

Trizol içine alınan hasta kan/kemik iliği örnekleri ile kontrol grupları örneklerinin üzerine kloroform eklenerek gradiyent santrifügasyon ile farklı fazlara ayrılması sağlandı. Ara faz olan aköz fazda bulunan RNA toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı. Etanol ile RNA presipite edildi ve santrifüj ile çöktürüldü. RNA yeniden etanol ile yıkanarak Rnase free su ile çözündürüldü. Örnek kalite ve kantite tayini içine spektrofotometrik ölçümün yanı sıra agaroz jele yüklendi ve gözlemlenen farklı çeşitlilikteki bantların her biri bioanalizöre (agilent 2100) yüklendi. Agaroz jel benzeri yongalar taşıyan bioanalizöre yüklenen örneklerde 18S(~1800bp) ve 28S(~3800bp) RNA piklerinin yanı sıra 40 ile 200bp arasında küçük RNA ların pik verdiği bölgede kolaylıkla gözlenebilir (şekil3-1).



Şekil 3-1: Bioanalizörde MiRNA Görüntülenmesi (139)

Ayrıca örnekler %1'lik agaroz jele yüklenerek, örneklerin RNA kalitelerine bakıldı. Yüklenen pozitif kontrol ile örneklerin “küçük RNA” varlıkları incelendi (şekil3-2).



Şekil 3-2: Jelde RNA Alt Ünitelerinin Görüntülenmesi

3.4.3. Hedef miRNA Seçilmesi

Önceki çalışmalarda T-ALL hastalarında anlamlı bir azalma saptadığımız *SKIL* genine özgün miRNA lardan biri olan *hsa-mir-223* ün belirlenmesi için akademik kullanıma açık veri tabanları (mirWalk, Targetscan,mirBase vb...) kullanıldı (şekil3-3).



Gene Name	RefSeqID	MicroRNA	StemLoop ID	Seed Length	Start	Sequence	End	Region	Pvalue
SKIL	NM_005414	hsa-miR-579	hsa-mir-579	9	2910	UUCAUUUGG	2902	3 UTR	0.0015
SKIL	NM_005414	hsa-miR-23a	hsa-mir-23a	7	3051	AUCACAU	3045	3 UTR	0.0232
SKIL	NM_005414	hsa-miR-32	hsa-mir-32	7	3045	UAUUGCA	3039	3 UTR	0.0232
SKIL	NM_005414	hsa-miR-92a	hsa-mir-92a-1	7	3045	UAUUGCA	3039	3 UTR	0.0232
SKIL	NM_005414	hsa-miR-212	hsa-mir-212	7	2735	UAACAGU	2729	3 UTR	0.0232
SKIL	NM_005414	hsa-miR-216a	hsa-mir-216a	7	2873	UAAUCUC	2867	3 UTR	0.0232
SKIL	NM_005414	hsa-miR-223	hsa-mir-223	7	2762	UGUCAGU	2756	3 UTR	0.0232

Şekil 3-3: Veri Tabanlarından *SKIL* Geni Hedef miRNalarının Belirlenmesi (www.umm.uni-heidelberg.de)

3.4.4. Gen Spesifik cDNA sentezi ve Gerçek Zamanlı Kantitasyon

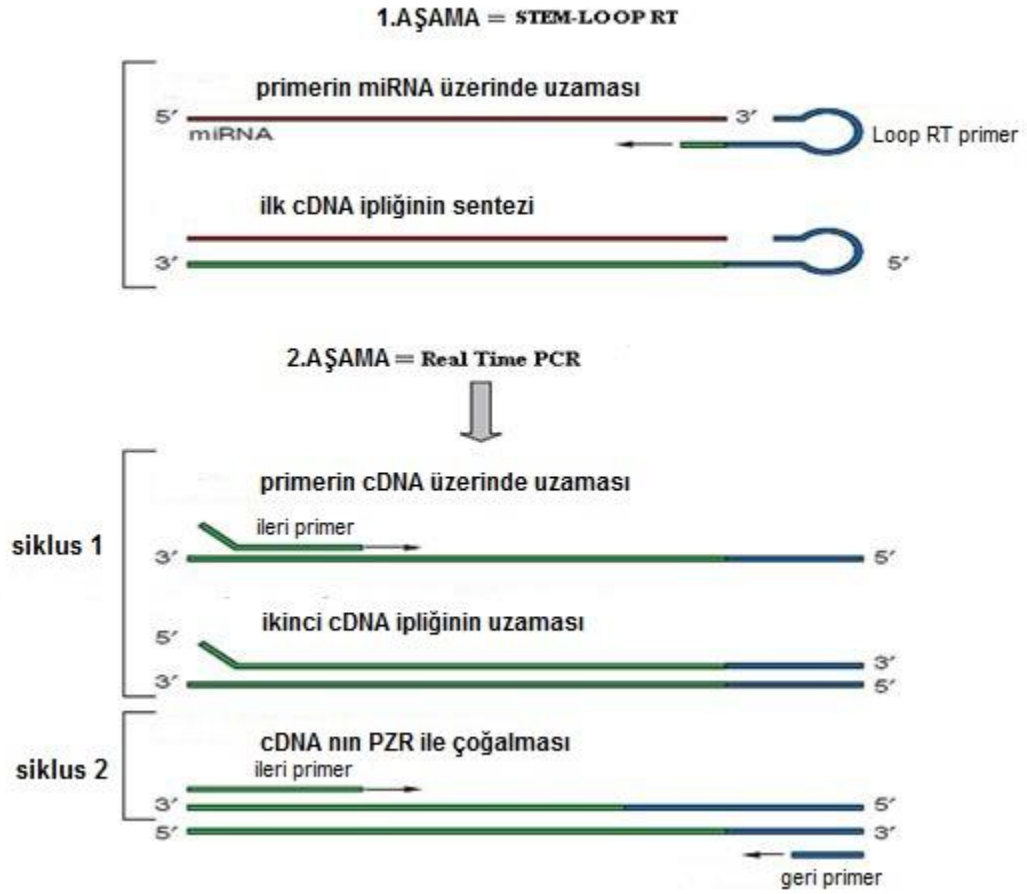
3.4.4.1. Stem-loop RT Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hücrelerde az miktarda bulunan miRNA lar klonlama, northern blot hibridizasyon ve mikrodizilim analizleri gibi teknolojilerle rutin belirlemelerden kaçabilir. miRNA miktarını belirlemede yeni bir yöntem olan ‘Stem-Loop Ters Transkriptaz Polimeraz zincir reaksiyonu (“reverse transcriptase”=RT-PZR); hızlı, kesin ve hassas bir şekilde, miRNA gen anlatımı profilinin tespitine imkan sağlar. “Stem-loop” RT-PZR yöntemi, DNA kontaminasyonundan etkilenmez, olgun miRNA’lara özgüdür ve ilgili miRNA’lar arasındaki bir nükleotidlik farkı bile ayırt edebilir.

Bu işler iki Basamakta gerçekleşir.

1-İlk olarak miRNA ya özel stem-loop RT primerler kullanılarak total RNA dan hedef cDNA sentez edilir.

2-Elde edilen cDNA lardan, miRNA spesifik ileri primer ve evrensel geri primer kullanılarak ilgili bölgenin çoğalması sağlanır (şekil3-4).



Şekil 3-4: Stem Loop PCR ile cDNA Yapılması ardından Gerçek Zamanlı PZR ile miRNA Kantitasyonu (140)

3.4.4.2.Stem-Loop RT-Primer Dizayını

miRNA lar için “stem-loop” RT primerleri; RT verimliliği ve özgünlüğü açısından konvansiyonel primerlerden (linear primerlerden) daha kullanışlı olduğu gösterilmiştir. “Stem-loop” RT primerlerinin ortak bir ana dizileri olmalıdır. Bu ortak ana dizinin 5’ ve 3’ ucundaki komplementer dizilerden dolayı “stem-loop” yapısını alabilmektedir. Ayrıca Loop bölgesinde UPL prob #21’in eş bölgesini içermektedir. Primerin özgünlüğünü ise hedef miRNA’nın 3’ ucuna bağlanan 6 nükleotidlik bir dizi sağlar. Hedef genimiz olan *SKIL* i hedefleyen miRNA lardan biri olan *mir-223* ve 2 adet

referans miRNA (RNU6 ve SNORD24) bu çalışmada kullanılmıştır. RT primer dizileri tabloda gösterilmiştir (tablo3-3).

Tablo 3-3: cDNA Sentezi için Kullanılan Gen Spesifik Primer Dizileri

<i>miR-223</i>	
Dizisi	5'-UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA-3'
RT Primer Dizisi	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACTGGGGT-3'
<i>RNU6-1</i>	5'-GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGGAACGATACAGA GAAGATTAGCATGGCCCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGA AGCGTTCCATATTTT-3'
RT Primer Dizisi	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACAAA TATGGAAC-3'
<i>SNORD24</i>	5'-TGCAGATGATGTAAGAATATTTGCTATCTGAGAGATGGTGATGA CATTTTAAACCACCAAGATCGCTGATGCA-3'
RT Primer Dizisi	5'-GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACcagagccaACTGCATCAG- 3'

3.4.4.3. “Stem-loop” RT ile Gen Spesifik cDNA Sentezi

Spektrofotometrede konsantrasyonları ölçülen RNA örnekleri 10µl de 1µg olacak şekilde sulandırıldı. 1µl gen spesifik primerler ve 1µl 10mM dNTP mix eklenerek 65°C de 5dk. inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı eklenmek üzere buza alındı (tablo3-4).

Tablo 3-4: Gen Spesifik cDNA Sentezinde Kullanılan Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon karışımı	Miktar
5X “First strand” tampon	4µl
0.1M DTT	2µl

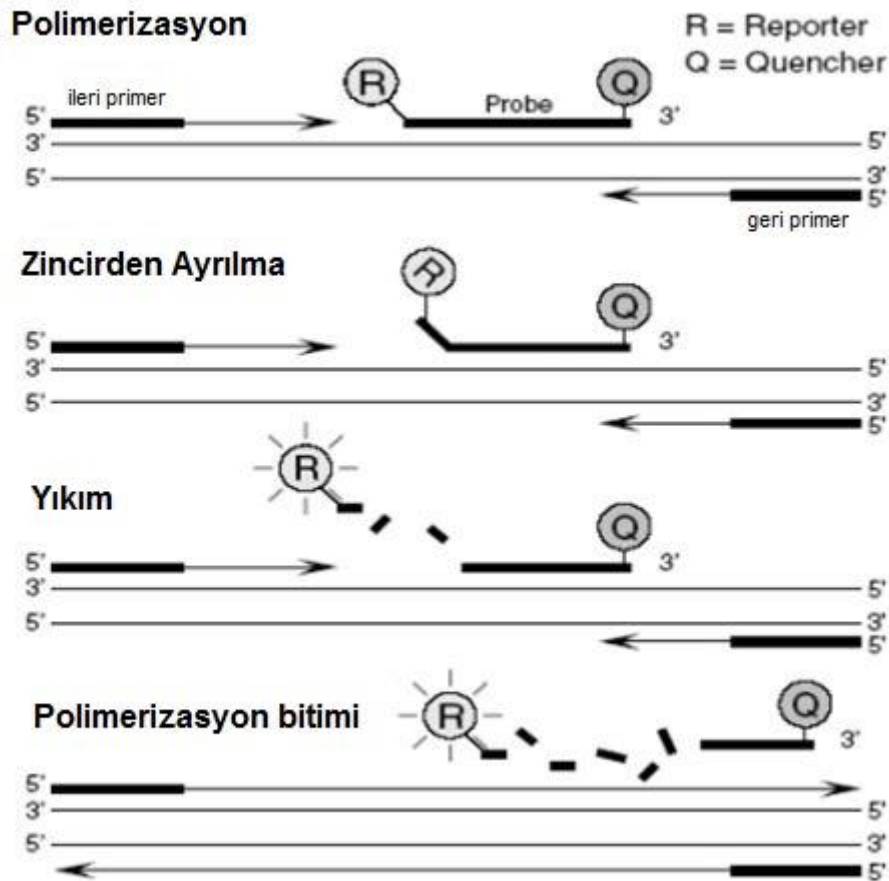
Bu karışım eklendikten sonra 42°C de 2dk. Örnekler inkübe edildi. Buz üzerinde her bir örneğe 1.5 µl Superscript RT eklendikten sonra 42°Cde 50dk. Ardından da 70°Cde 15dk. İnkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri, gen spesifik primerler kullanıldığı için sadece hedef miRNA ve referans miRNAları içermektedir.

3.4.4.4. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Eş zamanlı kantitatif PZR, amplifikasyon gerçekleşirken bilgisayar ekranından eş zamanlı olarak izlenilebilen, floresan işaretleyicilerin kullanıldığı ve alınan floresan yoğunluğunun, amplifikasyon ürünü ile doğru orantılı olarak arttığı bir yöntemdir. Özgün (işaretli proplar) ya da özgün olmayan fluoesan işaretleyiciler (SYBR green vb) kullanılmaktadır.

Bu çalışmada hidroliz prob çalışma prensibine dayanan UPL probları kullanılmıştır. Hidroliz probları DNA’ya komplementer olan ve fluoesan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-

karboksifloresin= 6-FAM) ve 3' ucunda "quencher" (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) olarak adlandırılan işaretli eklentiler bulunmaktadır. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası, 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Prob hedef DNA'ya bağlanma durumunda fluoressan sinyal ölçümü düşüktür. Çoğaltılma sırasında ise hedef nükleik asit dizisi üzerinde primerler bağlanma bölgeleri arasında hidroliz proplar bağlanırlar. Primerlerin bağlanmasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlı olduğu bölgeye gelindiğinde Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3 nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her bir döngüde ürün çoğalımı oldukça fluoressan salınımı da bu artışa bağlı olarak devam eder (şekil3-5).



Şekil 3-5: UPL proba Kantitatif Eş Zamanlı PZR Prensibi (www.dkfz.de)

Bu çalışmada kantitasyon için, “stem loop” RT cDNA sentezi sonrasında sentezlenen her bir miRNA'nın ortak dizi bölgesinde komplementer dizisi yer alan prob 21 kullanılmıştır. Kullanılan primer ve prob dizileri tabloda belirtilmiştir (tablo3-5).

Tablo 3-5: Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR de kullanılan Primer ve Prob Dizileri

<i>Mir-223</i>	
Forward Primer	
Dizisi	5'-TCGCGGTGTCAGTTTGTCAAAT-3'
Reverse Primer	
Dizisi	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'

<i>RNU6-1</i>	
Forward Primer	
Dizisi	5'-TGTGCTCGCTTCGGCA-3'
Reverse Primer	
Dizisi	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'

<i>SNORD24</i>	
Forward Primer	
Dizisi	5'-TGCGGTGCAGATGATGTAAAAGA-3'
Reverse Primer	
Dizisi	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3'

UPL Probe 21	
Dizisi	5'-TGGCTCTG-3'

Referans genler, farklı dokularda anlatımının sabit/değişmez olduğu bilinen, genler arasından seçilir. Referans genler ile verilerin normalizasyonu, gerçek zamanlı

PZR yönteminde, mRNA kantifikasyonu için ana basamaklardan biridir. Bu çalışma için *RNU6* ve *SNORD24* ALL tipleri arasında az miktarda bir varyasyon gösterdiği için referans gen olarak seçilmiştir.

Tablo 3-6: Eş Zamanlı Kantitatif PZR de Kullanılan Karışım

ReaksiyonKarışımı	Miktarı
İleri ve geri primerlerden (5uM)	1 µl
Hidroliz probundan (0.5uM)	0.2 µl
LightCycler480 prob reaksiyon karışımı (5XX)	5 µl

Son hacmi 8 ul olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak hazırlanan karışım 96 kuyucuklu plakalara dağıtıldı. Karışım dağıtılan her bir kuyucuğun üzerine hasta örneğinden 2 ul (1000 ng/ul) cDNA eklenerek gerçek zamanlı PZR gerçekleştirildi (tablo3-6).

Belirlenen miRNA lar Lightcyler 480 cihazında çalışıldı. Pre inkübasyon 50°C 2 dak., inkübasyon 95°C de 10 dak., amplifikasyon 95°C de 15 sn. ve 60°C de 1 dak. 40 döngü olarak gerçekleştirildi.

3.4.5. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında insan pre B-ALL hücre serileri (NALM6, REH) ve karışık populasyona sahip T-ALL hücre serileri kullanılmıştır. (JURKAT, MOLT4, CEM, RPMI8402, DND41). Hücreler (10⁶/ml) %10 FBS, streptomisin (100mg/mL) ve penisilin (100U/mL) (50mg/mL; Invitrogen Life Sciences, USA) içeren RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, USA) besiyerinde; %5 CO₂ içeren ortamda 37°C de inkübasyona bırakılmıştır.

3.4.6. İstatistiksel Analiz

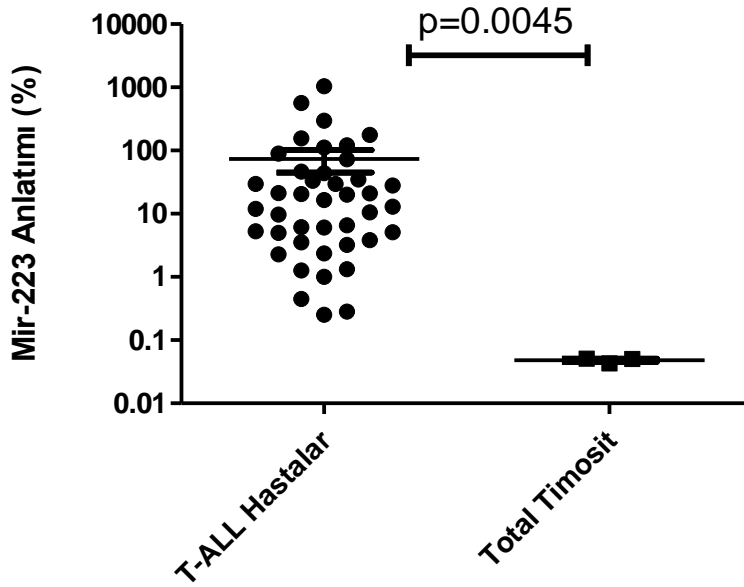
Hastaların ve kontrollerin relatif mRNA düzeylerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Mann-Whitney testi niceliksel ölçekli gözlemleri verilen iki örneğin aynı dağılımdan gelip gelmediğini incelemek için kullanılan bir parametrik olmayan istatistik testidir. İki bağımsız grubun ortancalarını (medyan) karşılaştırmak için kullanılır.

Sağ kalım analizleri Kaplan-Meier Metodu ile belirlendi. Analizler için Graphpad Prism 5 programı kullanıldı. Sağ kalım üzerindeki çoklu değişken analizlerinde Cox Regresyon Testi gerçekleştirildi. Analizler için SPSS 15.0 programı kullanıldı. Her iki analizde de p değerleri $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Cox regresyon testinde regresyon kat sayısı (B) pozitif, p değeri (sig) anlamlı ve risk değeri ($\text{Exp}(B)$) > 1 olan değişkenler kötü prognostik belirteç, regresyon kat sayısı negatif, p değeri anlamlı ve risk değeri ($\text{Exp}(B)$) < 1 olan değişkenler ise iyi prognostik belirteç olarak değerlendirildi. Genel sağ kalım süresi tanı anından ölüm tarihine yada son kontrol tarihine kadar olan süre olarak belirlendi. Relapsız sağ kalım ise tam remisyona girdikten sonra son kontrol tarihine kadar veya relaps gözlenen hastalarda relaps tarihine kadar geçen süre olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.3. T-ALL hastalarında *mir-223* gen anlatımı düzeyleri

13 kız 29 erkek olmak üzere toplam n=52 pediatrik T-ALL hastası ve kontrol grubu olarak sağlıklı timus dokusundan elde edilen timositlerde (n=3) *mir-223* gen anlatım seviyesi “stem loop PZR” ve qRT-PZR yöntemleri ile incelendi. Çalışmadan örnek kalitesinin yetersizliği nedeni ile 10 hasta dışlandı. Hastalara ait *mir-223* anlatımı kontrollerle (total timosit) kıyaslandığında pediatrik T-ALL hastalarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. (p=0.0045, Mann Whithney test)(şekil4-1)

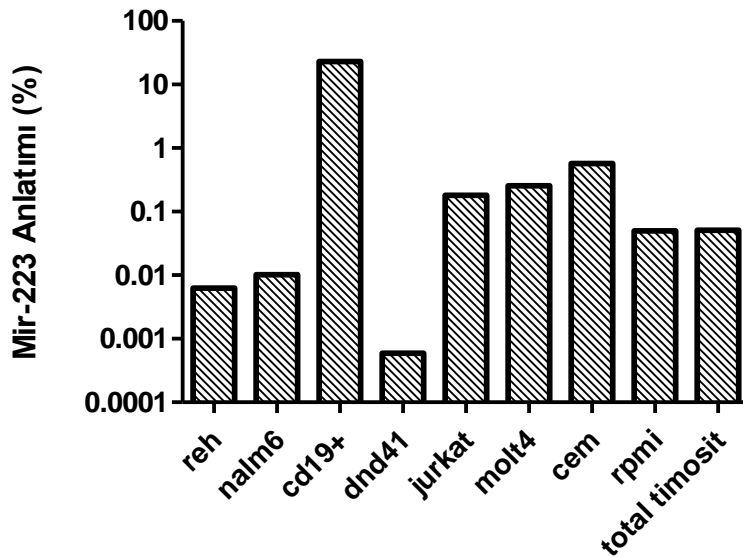


Şekil 4-1: *mir-223* ün T-ALL Hastalarında mRNA Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi

Referans gen olarak 2 house keeping genin (RNU6 ve SNORD24) geometrik ortası alınarak, hedef gen değerleri normalize edildi. Değerler logaritmik ölçekte gösterilmektedir.

4.4. T ve B ALL hücre serilerinde *mir-223* gen anlatımı düzeyleri

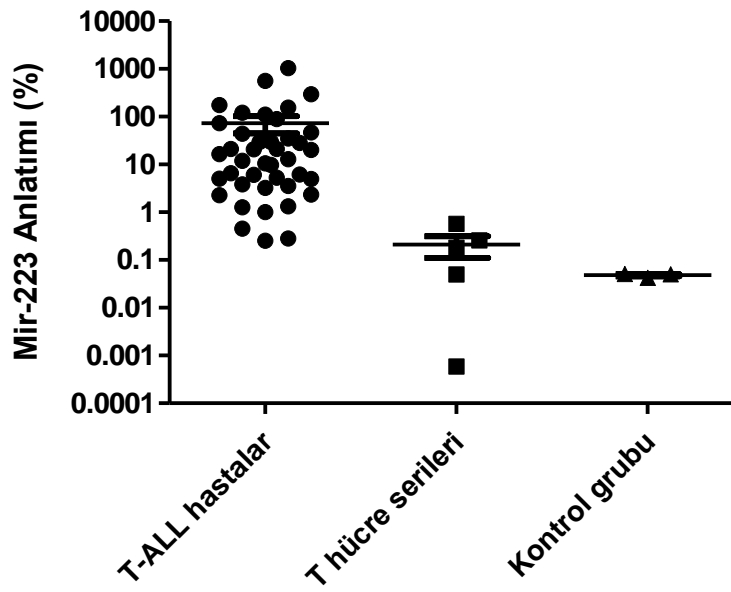
T-ALL (CEM, RPMI 8402, JURKAT, MOLT 4, DND 41) ve B-ALL (REH, NALM 6) hastalığını temsil eden hücre serilerinde *mir-223* gen anlatımı tespit edildi. T ve B hücre serileri kendi aralarında *mir-223* anlatımına göre kıyaslandığında ise T hücre serilerinde anlatımın, neredeyse hiç anlatım göstermeyen B hücre serilerine göre yüksek olduğu gözlemlendi (şekil4-2).



Şekil 4-2: Hücre Serilerinde ve Kontrollerde *mir-223* Anlatımı

T-ALL(dnd41, Jurkat, Cem, Molt4, Rpmi) ve B-ALL(reh, nalm6) hücre serilerinde, Timosit kontrollerinde (total timus dokusu) *mir-223* anlatım düzeyleri. Değerler logaritmik ölçekte gösterilmektedir.

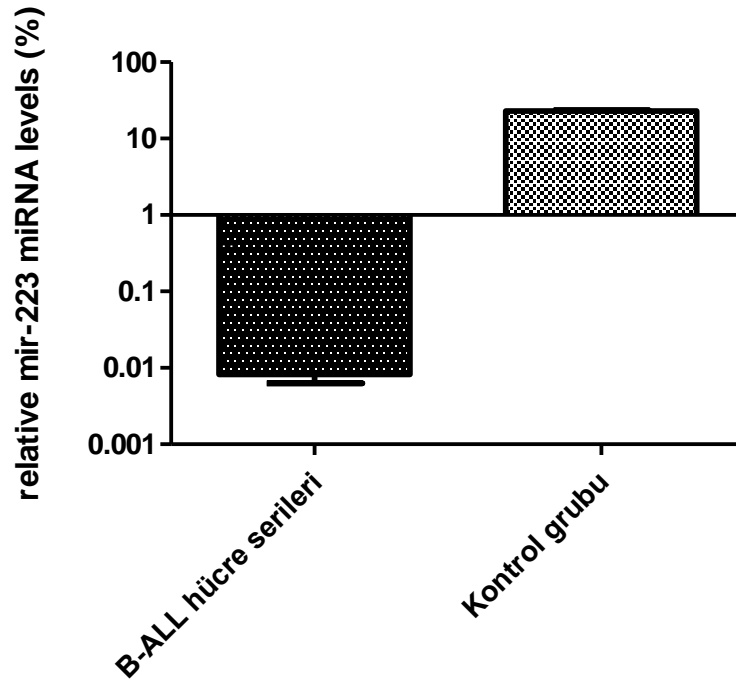
Hücre serileri ve T-ALL hasta sonuçları kontrollerle kıyaslandığında hücre serilerinden elde edilen sonuçlar T-ALL hastalarından elde edilen sonuçlara paralel olarak bulundu. Yüksek mir-223 anlatım seviyesi T hücre serilerinde de aynı şekilde gözlemlendi (şekil 4-3).



Şekil 4-3: mir-223 ün T-ALL Hastalarında ve T hücre Serilerinde Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi

Referans gen olarak 2 house keeping genin (RNU6 ve SNORD24) geometrik ortası alınarak, hedef gen değerleri normalize edildi. Değerler logaritmik ölçekte gösterilmektedir.

Fakat T hücre serilerinin aksine B hücre serilerinde *mir-223* anlatımı kontrol grubu olarak kullanılan periferik kan CD19+ hücrelere göre azalma göstermekteydi (şekil4-4).

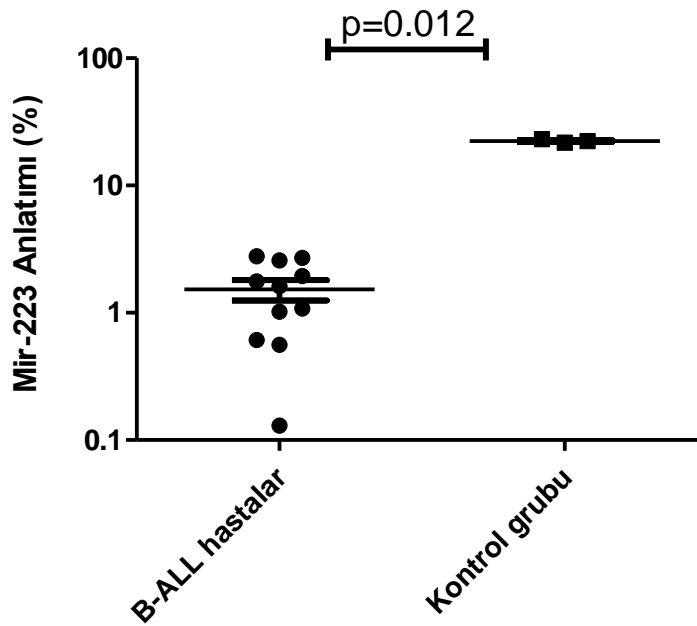


Şekil 4-4: mir-223 ün B-ALL Hastalarında Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi

Referans gen olarak 2 house keeping genin (RNU6 ve SNORD24) geometrik ortası alınarak, hedef gen değerleri normalize edildi. Değerler logaritmik ölçekte gösterilmektedir.

4.5. B-ALL Hastalarında *mir-223* miRNA Anlatımı

B hücre serilerinde T hücre serilerine göre anlamlı bir *mir-223* anlatım farklılığı gözlemlenmesi üzerine *mir-223* ün T hücre soyuna özgünlüğünün tartışılabilmesi için B-ALL (n=11) hastalarında *mir-223* miRNA anlatımları incelendi. Kontrol grubu olarak kullanılan periferik kan CD19+ hücelere kıyasla aynı hücre serilerindeki gibi, hastalarda da anlatımda anlamlı bir azalma gözlemlendi (p=0.012, Mann Whitney test) (şekil4-5).



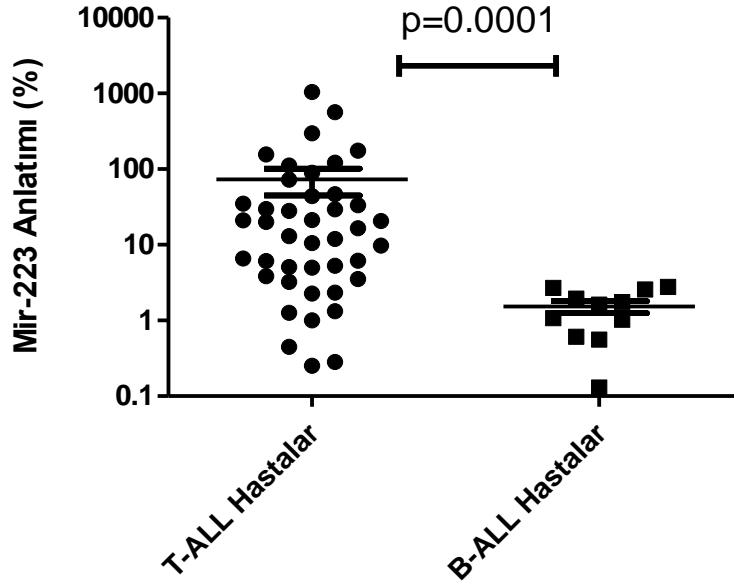
Şekil 4-5: *mir-223* ün B-ALL Hastalarında Anlatımlarının Eş Zamanlı Kantitatif PZR ile Belirlenmesi

Referans gen olarak 2 house keeping genin (RNU6 ve SNORD24) geometrik ortası alınarak, hedef gen değerleri normalize edildi. Değerler logaritmik ölçekte gösterilmektedir.

4.6. T ve B ALL Hastalarında *mir-223* Anlatım Seviyelerinin Kıyaslanması

Mir-223 anlatım seviyeleri hücre serilerinde incelendiğinde T hücre serilerinde B hücre serilerine nazaran daha yüksek *mir-223* anlatımı gözlemlenmişti. Bu verilere paralel olarak T ve B ALL hasta popülasyonu kıyaslandığında *mir-223*ün anlatım

seviyesi T ALL hastalarında anlamlı bir şekilde daha yüksekti ($p=0.0001$, Mann Whitney test) (şekil4-6).



Şekil 4-6: mir-223 ün B ve T ALL Hastalarında Anlatımlarının Kıyaslanması

Referans gen olarak 2 house keeping genin (RNU6 ve SNORD24) geometrik ortası alınarak, hedef gen değerleri normalize edildi. Değerler logaritmik ölçekte gösterilmektedir.

4.7. T-ALL Hastalarında *SKIL* ve *miR-223* anlatımlarının kıyaslanması

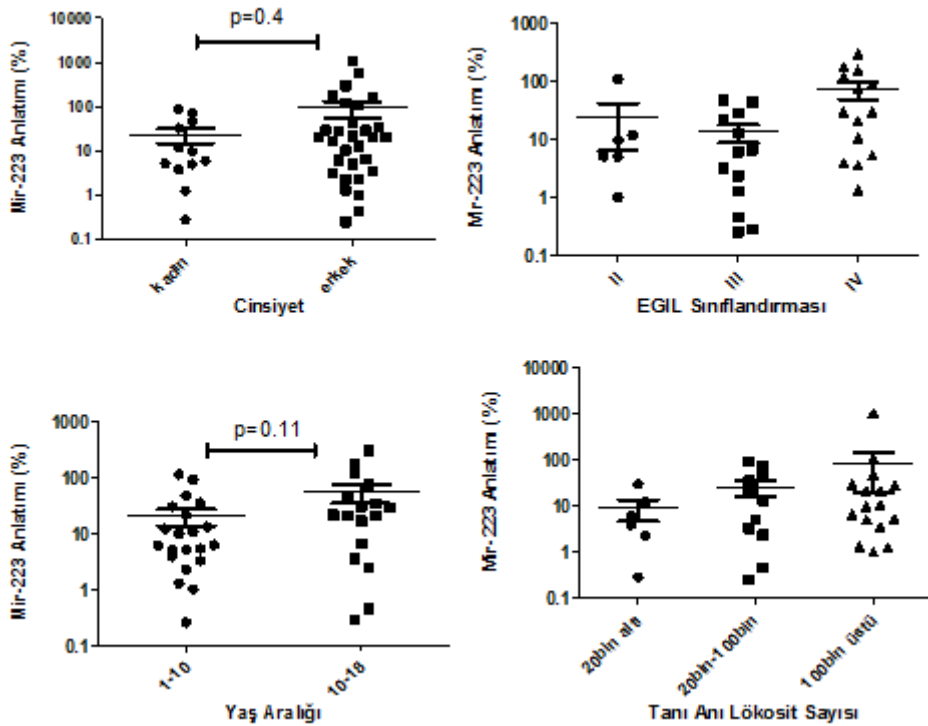
Her bir hastanın *SNO/SKIL* gen anlatım düzeyleri ile *mir-223* düzeyleri karşılaştırıldı. Hastaların tümü *mir-223* anlatımı bakımından kontrollere kıyasla yüksek anlatım gösterirken, *SKIL* anlatımı bakımından ise düşük anlatım göstermekteydi.

Hasta Adı	Mir-223 Anlatım seviyesi	SKIL Anlatım Seviyesi
T27		
T31		
T49		
T52		
T53		
T54		
T58		
T59		
T62		
T64		
T71		
T74		
T76		
T82		
T84		
T85		NA
T86		
T93		
T97		NA
T98		
T99		
T104		
T107		
T108		NA
T109		
T114		
T119		
T120		
T122		
T124		
T130		
T131		
T133		
T134		
T142		
T143		
T144		
T145		
T146		
T147		
T148		
T149		

Şekil 4-7: T-ALL Hastalarında mir-223 ve SnoN/SKIL Genlerinin Anlatımlarının Şematize Olarak Kıyaslanması

4.8. *Mir-223* Bulgularının T-ALL hastalarının klinik özellikleri ile ilişkisi

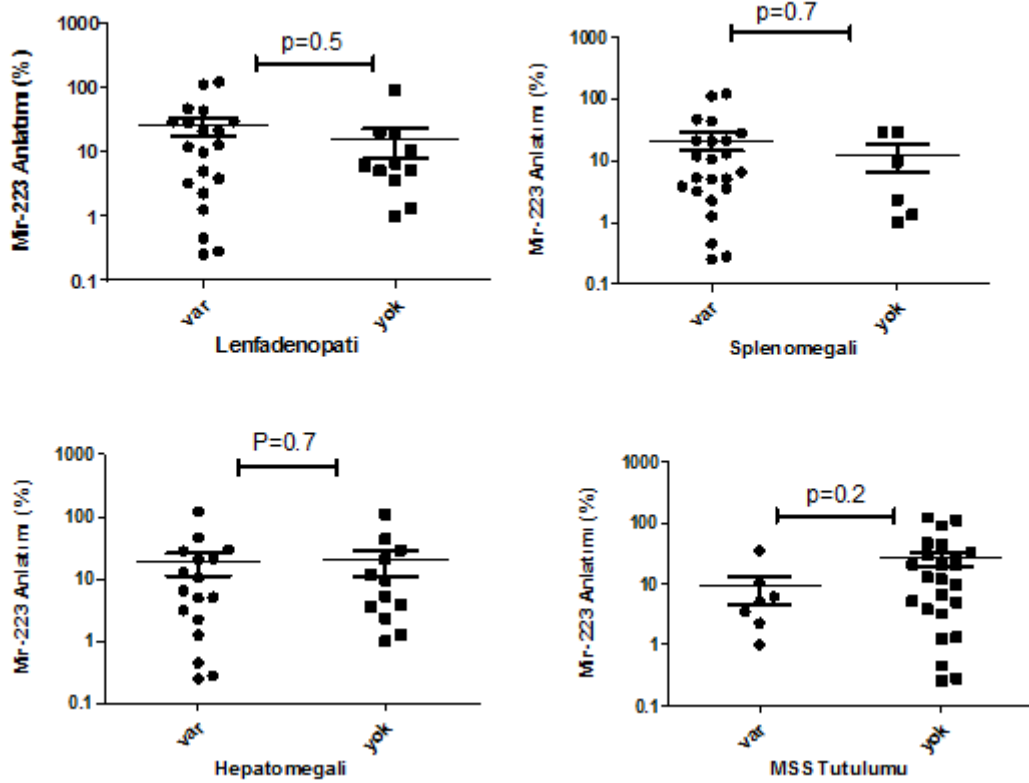
Mir-223 fenotipteki yansımalarını tespit etmek için, *mir-223* mRNA düzeyleri, T-ALL hastalarının klinik özellikleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. *Mir-223* anlatımının; cinsiyet ($p = 0,40$), yaş ($p = 0,11$), tanı zamanı beyaz kan hücre sayısı, immünofenotip açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir. Fakat 1-10 yaş grubundaki hastaların, 11-18 yaş grubu hastalarına göre daha düşük *mir-223* anlatımı gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı şekilde tanı anı lökosit sayısı 3 gruba bölündüğünde (20bin altı, 20-100bin arası, 100bin üstü), tanı anı lökosit sayısı arttıkça *mir-223* anlatımında artış söz konusudur. EGIL sınıflandırmasına göre hastaların %2si grup1, %12si grup2, %33ü grup3, %28i grup4 te yer aldığı tespit edilmiştir. Grup 3 ve 4te yer alan hastalar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p=0.02$). (şekil4-8).



Şekil 4-8: Hasta Klinik Bulguları ve *mir-223* Anlatımlarının Karşılaştırması I

İstatistiksel Analizler Graphpad Prism 5 programında gerçekleştirildi, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

Hastaların tanı anında %45inde lenfadenopati(lap), %57sinde splenomegali(sm), %43ünde hepatomegali (hm) tespit edilmiştir. Ayrıca %17sinde Merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu vardır. Organ Tutulumları var olan hastalar tutulumu olmayan hastalara göre mir-223 anlatımı bakımından incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (lap; $p=0.5$, sm; $p=0.7$, hm; $p=0.7$, mss; $p=0.2$). Ancak Lenfadenopatisi olan hastalarda mir-223 anlatımı olmayanlara göre göreceli artmıştır. Bunun aksine merkezi sinir sistemi tutulumu olan hastalarda ise mir-223 anlatımı olmayanlara göre göreceli azalmıştır (şekil4-9).

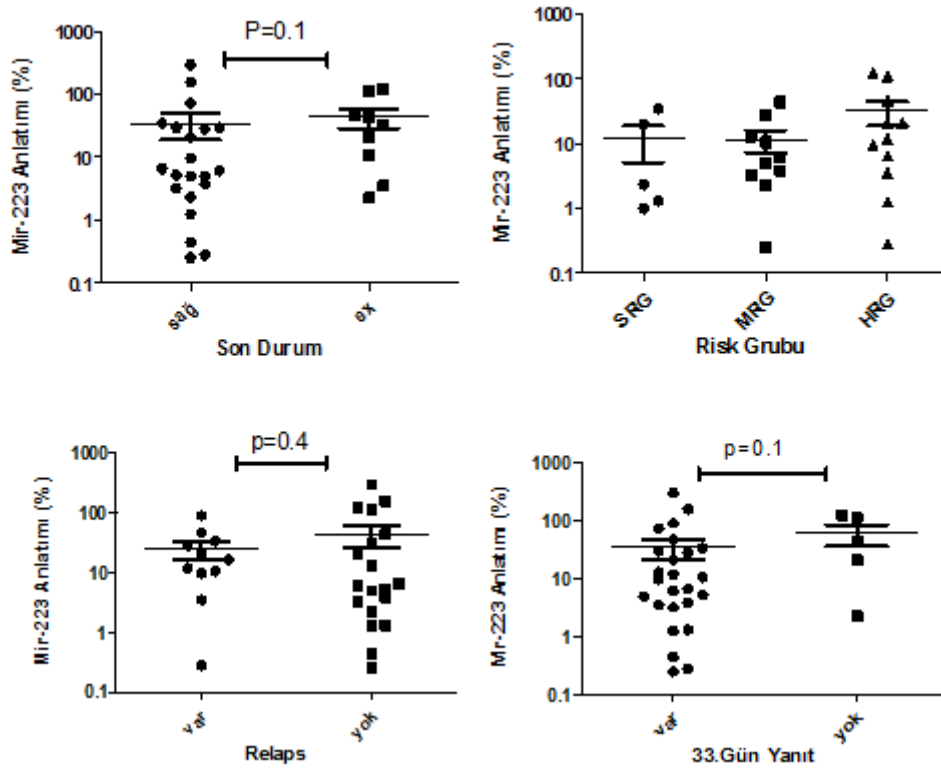


Şekil 4-9: Hasta Klinik Bulguları ve mir-223 Anlatımlarının Karşılaştırması II

İstatistiksel Analizler Graphpad Prism 5 programında gerçekleştirildi, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

Hastalar uygulanan tedavi protokolleri, risk grupları ve tedaviye yanıtları bakımından incelendiğinde %61inde 33.gün yanıt, %29unda relaps vardır. Hastaların %26sı ise ex olmuştur. Hastaların 1 tanesi GMALL, 2tanesi CCG protokolü ile geri

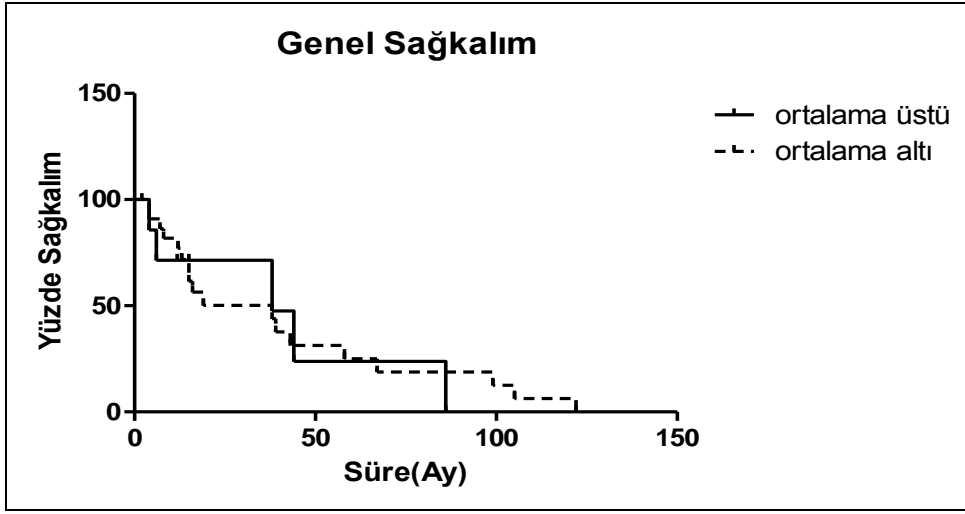
kalan tümü BFM protokolünde tedavi edilmiştir. Hastalar 33.gün yanıt varlığı yokluğu ve aynı şekilde relaps varlığı yokluğu açısından mir-223 anlatımları kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Fakat 33.gün yanıtı olan hastalar ($p=0.1$) veya relapsı olan hastalarda ($p=0.4$) olmayanlara nazaran mir-223 anlatımı göreceli düşüktür. Sağ olan hastalarda ise ex olanlara kıyasla mir-223 anlatımı göreceli yüksektir ($p=0.1$). Risk grupları açısından mir-223 anlatımı ele alındığında yüksek risk grubu(HRG) undaki hastaların mir-223 anlatımı orta risk grubu(MRG) ve standart risk gruplarına (SRG) nazaran göreceli yüksektir. Fakat istatistiksel olarak bir anlamlılık tespit edilmemiştir (SRG vs HRG $p=0.3$, MRG vs HRG $p=0.3$) (şekil4-10).



Şekil 4-10: Hasta Klinik Bulguları ve mir-223 Anlatımlarının Karşılaştırması III

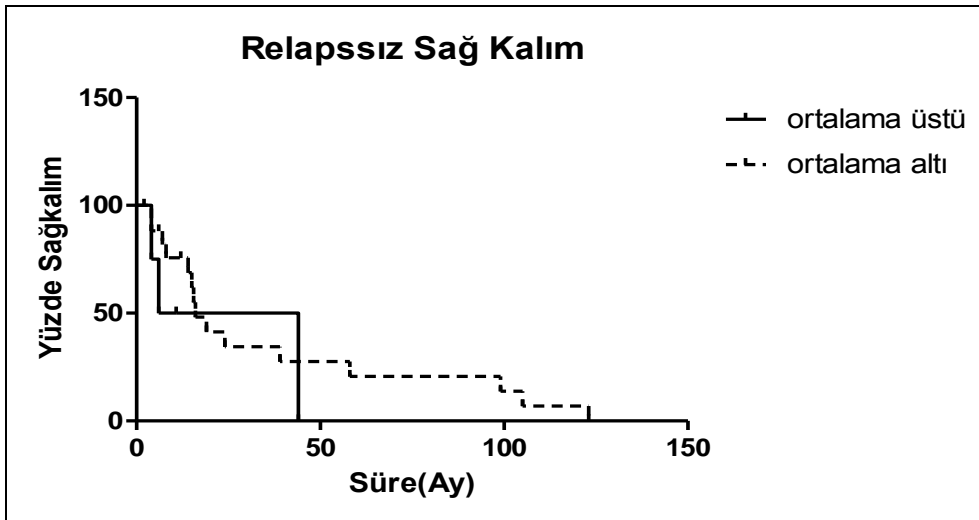
İstatistiksel Analizler Graphpad Prism 5 programında gerçekleştirildi, $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.

4.9. Mir-223 Bulgularının Hasta Sağ kalımları Üzerine Etkileri



Şekil 4-11: Kaplan Meier Sağ Kalım Analizi Genel Sağ Kalım

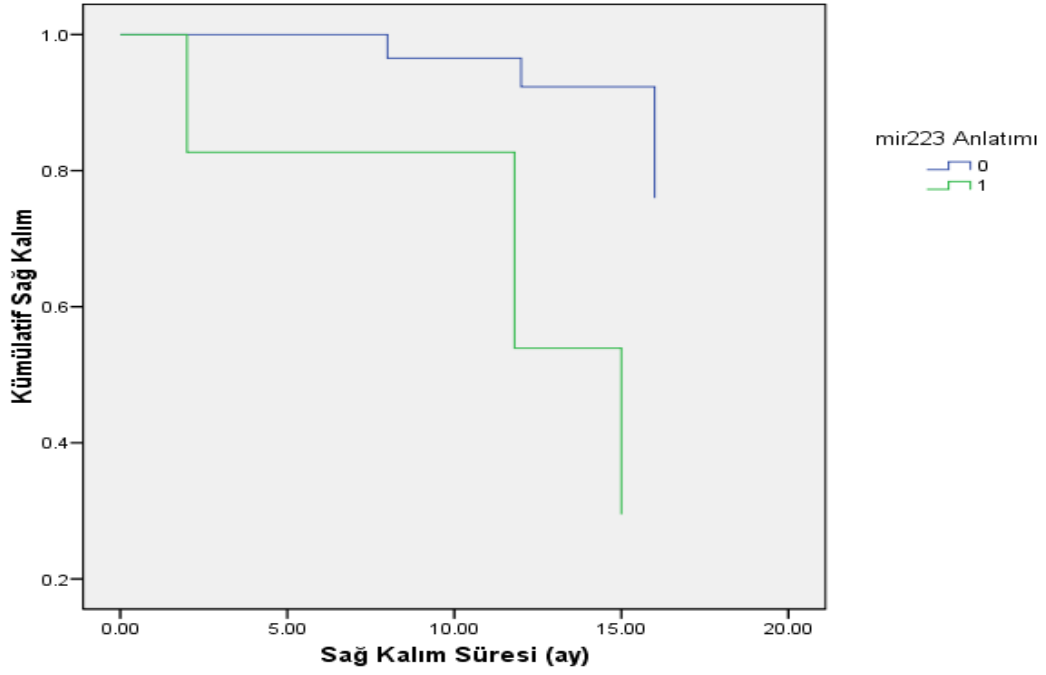
Mir-223 anlatım düzeylerinin, genel sağ kalım üzerine olan etkisi incelenmiştir. (p=0.8, Long-rank test)



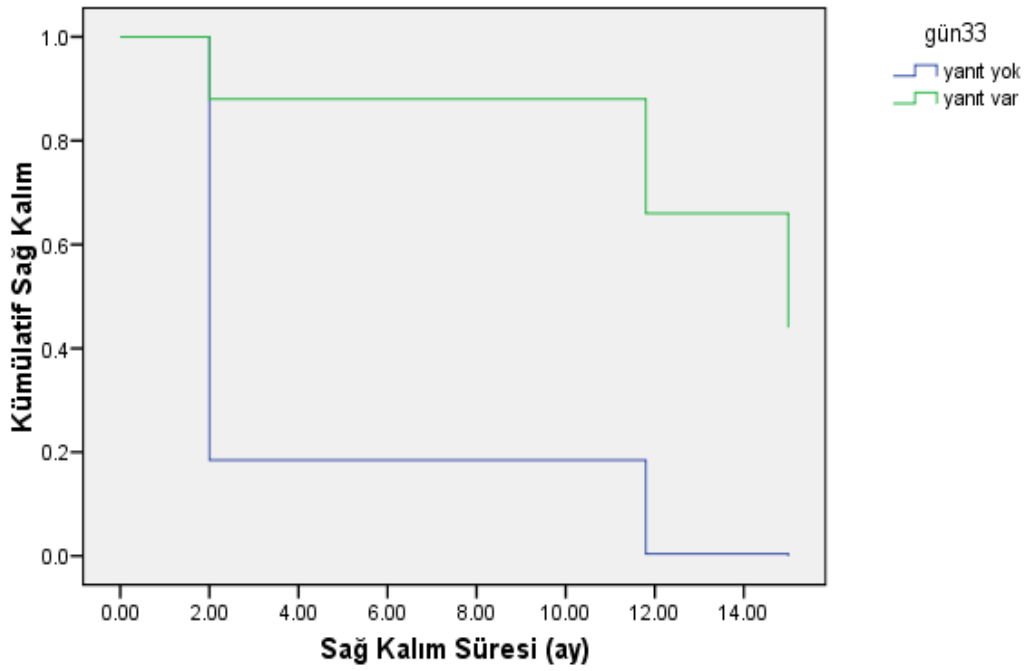
Şekil 4-12: Kaplan Meier Sağ Kalım Analizi Relapssız Sağ Kalım

Mir-223 anlatım düzeylerinin, relapssız sağ kalım üzerine olan etkisi incelenmiştir. (p=0.4, Long-rank test)

A)33.GünYanıt



B) mir223 anlatımı ortalama üstü



Şekil 4-13: Cox Regresyon Analizinde Elde Edilen Genel Sağ Kalım Eğrisi

A) 33.gün tedavi yanıtı değişkeni ile elde edilen genel sağ kalım beklentisi. Mir-223 anlatımı: 0;ortalama altı, 1;ortalama üstü, SPSS V15.0 programında analiz edilmiştir.

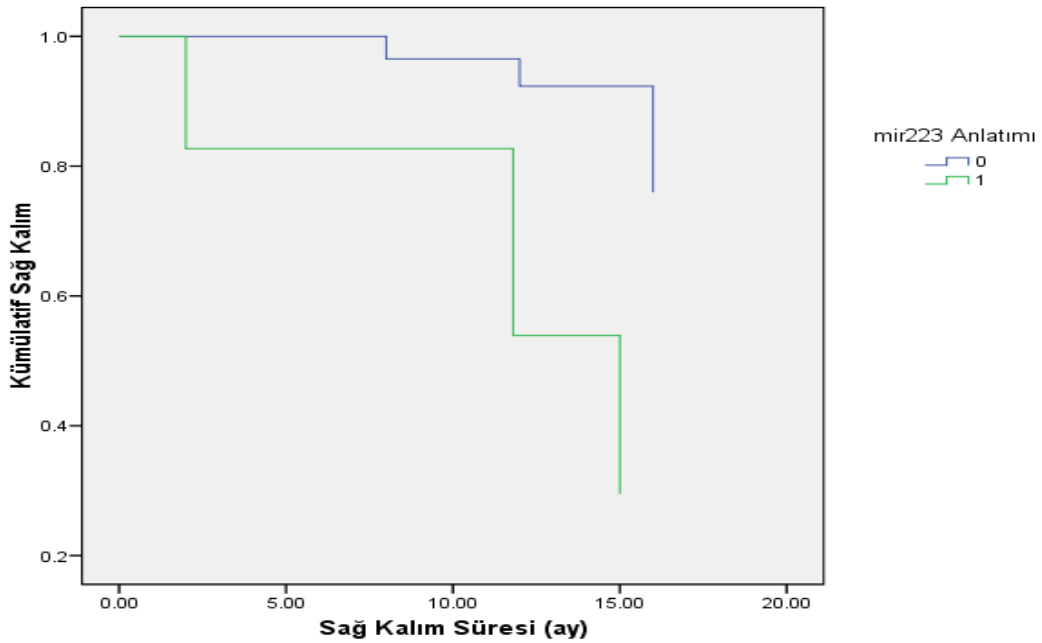
B) mir-223 anlatımı ortalama üstü olan hastalarda 33.gün yanıt varlığı ve yokluğu durumunda genel sağ kalım eğrisi.

Tablo 4-1: Cox Analizi Değişken Tablosu I

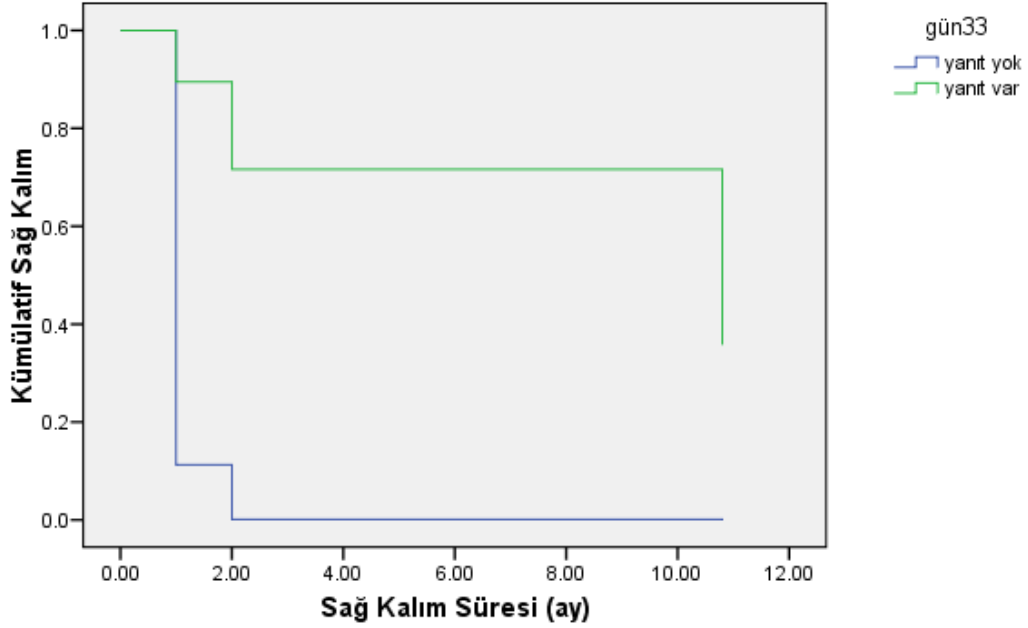
B; regresyon kat sayısı, Exp(B); risk değeri, Sig; anlamlılık değeri

	B	Exp(B)	Sig
33.Gün Tedavi Yanıtı	2.58	13.235	0.004

A)33.GünYanıt



B) mir-223 anlatımı ortalamanın üstü



Şekil 4-14: Cox Regresyon Analizinde Elde Edilen Relapsız Sağ Kalım Eğrisi

A) 33.gün tedavi yanıtı değişkeni ile elde edilen relapsız sağ kalım beklentisi. Mir-223 anlatımı: 0; ortalama altı, 1; ortalama üstü, SPSS V15.0 programında analiz edilmiştir.

B) mir-223 anlatımı ortalama üstü olan hastalarda 33.gün yanıt varlığı ve yokluğu durumunda relapsız sağ kalım eğrisi.

Tablo 4-2: Cox Analizi Değişken Tablosu II

B; regresyon kat sayısı, Exp(B); risk değeri, Sig; anlamlılık değeri

	B	Exp(B)	Sig
33.Gün Tedavi Yanıtı	2.979	19.670	0.015

5. TARTIŞMA

Son yıllara kadar, yapılan çalışmalar, tümör oluşumu ve gelişiminden birincil derecede sorumlu bölgelerin genomdaki protein kodlayan genler olduğunu düşündürmekteydi. “Mikro RNA” (miRNA) ların keşfi ile birlikte protein kodlamayan miRNA anomalilerinin de, kanser dahil birçok hastalığın patogeneze katkıda buldukları gösterilmiştir (26).

Lösemi çalışmalarında miRNA gen anlatım profillerinin malign ve normal hücrelerde farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca miRNA anlatım profillerinin lösemi alt tipleri arasında da ayırım yapılmasına yardımcı olabileceği gösterilmiştir (117). Hematopoezde farklı gelişim aşamalarında farklı miRNAlar aktif olduğu gibi, her hücre tipinin olgunlaşmasında da farklı miRNAların katkıda bulunduğu bilinmektedir.

miRNAlarda oluşabilecek herhangi tür mutasyon, düzenlenme değişimi veya işlev bozukluğu nörodejeneratif hastalıklardan diabete, kalp hastalıklarından kansere kadar çok geniş spektrumlu hastalık türlerinden biri ile sonuçlanabilir (90,91). Araştırmamız sonucunda 42 pediatik T-ALL hastasında *mir-223* anlatım seviyelerinin normal timus dokusuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, *mir-223* yüksek anlatımının hasta grubumuz için özellikle T-hücrelerine özgün ve onkogenik özellikte olduğunu göstermektedir. İlk defa pediatik T-ALL’de *mir-223* anlatımı bu çalışma ile belirlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda yetişkin T-ALL hastalarında ve 18 adet T-ALL hücre hattında, 430 farklı miRNAnın anlatım düzeyleri gerçek zamanlı PZR ile kantite edilmiş, *mir-223* en yüksek anlatımlı 10 miRNA arasında yer almıştır (49). Pediatik ALL hasta grubunda (hangi hücre kaynaklı bildirilmemekte) yapılan gerçek zamanlı PZR ile valide edilmiş tüm genom dizilimi çalışmasında ise *mir-223* anlamlı bulunan mirnalar arasındadır (127).

Lösemi dışında *mir-223*ün aşırı anlatımı yumurtalık, mide ve kolorektal kanserler ile de ilişkilendirilmiştir (131,132,142,148). Fakat bu durumun aksine karaciğer kanseri, kronik lenfoblastik lösemi (KLL) ve akut myeloid lösemi (AML) de *mir-223*’ün düşük anlatımı gözlemlenmiş ve tümör baskılayıcı (TB) özellikte bir mirna olabileceği de tartışılmıştır (143,144). Yani *mir-223*’ün kanser oluşum mekanizmasındaki rolü iki yönlü (TB veya onkogenik) olarak tartışılmaktadır.

Çalışmaya dahil ettiğimiz pediatrik T-ALL hastalarında olduğu gibi, hastalığı temsil eden T hücre hatlarında da *mir-223* anlatımının kontrollere kıyasla yüksek olması, aynı zamanda B hücre hatlarında, T hücre hatlarına kıyasla anlatımının düşük olması, *mir-223* anlatımının T hücre soyuna özgün olduğunu düşündürmektedir. Bu çalışmada, *mir-223* ün T-hücreli ALL'ye özgü olduğunun ispatlanabilmesi için B-ALL hastalarındaki anlatımları da incelenmiştir. T ve B hücreli ALL hastalarının *mir-223* anlatım seviyeleri kıyaslandığında, T-ALL hastalarındaki anlatım anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hematopoetik kök hücrelerde *mir-223* ektopik anlatımının, kök hücrelerin %30-50 oranında T hücreleri yönünde farklılaştığını, buna karşın B-hücre ya da myeloid seri yönünde bir değişiklik yaratmadığı göstermektedir (127). Diğer bir çalışmada ise *mir-223* anlatımı, tetiklenmiş hematopoetik öncüllerinin fareye enjekte edilmesi sonucunda, hücre sayılarında B yönünde artışının değişmediği, aksine T yönünde hücre sayısının artmasına neden olduğu bildirilmektedir. Bu iki çalışma mirnaları, hematopoetik hücre gelişim ve farklılaşma çalışmalarının odak noktası haline getirmiştir ve *mir-223*ün T soyuna özgünlüğünü kanıtlamıştır (149). Dolayısıyla sonuçlarımız *mir-223* ün T hücre soyuna özgünlüğünü savunan mevcut literatür bilgisini de desteklemektedir.

Granülositlerden, makrofajlara, T ve B hücrelerine kadar farklı hematopoetik sistem hücrelerinin gelişim evrelerinde görev alan miRNA anlatımlarının bozulması sonucu, hedef genlerinin düzenlenmelerini bozmak suretiyle hastalık patogenezi katkıda buldukları bilinmektedir (127). Çalışmamızın asıl çıkış noktası *SKIL* genindeki düzenlenme değişiminin nedenini araştırmaktır. Önceki yıllarda ekibimiz tarafından gerçekleştirilen tüm genom analizi ve gerçek zamanlı PZR ile yapılan validasyon çalışmasında *SKIL* geni anlatımının 31 pediatrik T-ALL hastasında kontrollere kıyasla anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi (141). Ski protein ailesinden olan *SKIL*, onkogenik özellikte, TGFβ yolağının baskılayıcısı görevinde olan ve regülasyon bozukluğu, yolağın aşırı aktivasyonu ile sonuçlanan anahtar bir genidir (134). T-ALL patogeneziindeki rolü kesin olarak bilinmemekle birlikte T hücre soyuna spesifik anlatımı olduğu bilinmektedir, ancak TGFβ yolağı normal hematopoezde rolü olan ve hematolojik hastalıklarda sık sık kontrolsüz çalışan bir sinyal ileti yoludur. *SKIL* geni bir onkogen olarak bulunmuş olsa da genin tumor baskılayıcı olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (136, 137). T-ALL hastalarında tespit edilen *mir-223*deki anlatım artışı ve *SKIL* genindeki deki mRNA azalışı, *mir-223*ün *SKIL* genini

düzenlediğini düşündürücü yöndedir. *Mir-223*ün *SKIL* genini düzenlediği yönünde herhangi bir çalışma henüz mevcut değildir fakat akademik kullanımlı veritabanlarında (mirbase, mirwalk, targetscan vb.) *SKIL* geni, *mir-223*ün öngörülen hedef genleri arasında gösterilmektedir. Apoptotik yolak genlerinden; *BCL2*, *CASP3*, transkripsiyon faktörlerinden; *TCF3*, *CEBPA*, *RUNX1*, *LMO2*, *MEF2C*, *SOX2*, hücre bölünmesinden sorumlu; *AKT1*, *NFKB1*, tirozin kinazlardan *BCR*, *JAK2* ve onkogen olarak bilinen *MYC*, *SKIL* dışında T-ALL patogeneze katkısı olduğu bilinen ve *mir-223*ün hedeflediği valide edilmiş genler arasında yer almaktadır. *Mir-223*ün hastalardaki aşırı anlatımının bu genlerin bir veya birkaçının düzenlenmesini etkileyerek onkogenik/tümör baskılayıcı özelliğini gösterdiği düşünülebilir. *Mir-223* aşırı anlatımı tetiklenmiş vektörlerle yapılan fare çalışmalarında T-ALL oluşumu gözlemlenmiştir. *Mir-223* ün anlatımının antimir oligoları ile baskılanması sonucunda ise hedeflediği tümör süpresör nitelikteki genlerin (*PTEN*, *FWBX7*vb.) anlatımlarının arttığı görülmüştür. Bu şekilde *mir-223* ve düzenlediği gen arasındaki ilişki ortaya çıkartılabilmıştır (49). Bu bilgiler doğrultusunda T-ALL de *Mir-223*ün, *SKIL* veya patogeneze katkısı bulunduğu düşünülen genlerden birinin regülasyonunda görev alıp almadığının kanıtlanması için ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç vardır.

mir-223 anlatımının, hastaların klinik özellikleri ve hastalığın prognozu ile ilişkisi incelendiğinde, *mir-223* anlatım düzeyleri ile yaş (0-10 yaş / 10-18 yaş), cinsiyetkız/erkek), tanı zamanı beyaz kan hücre sayısı (50bin üstü/ 50bin altı), EGIL risk grupları (I-II-II-IV), organomegali (var/yok) arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. *mir-223* anlatımının erken dönem pro-T hücrelerinde anlatımının başladığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (127). EGIL sınıflandırmasına göre hastalar dört grup (TI,TII,TIII,TIV) altında toplandığında TIV sınıfına giren en olgun T grubu hastalarda *mir-223* anlatımı diğer erken dönem gruplardan daha yüksek olduğu ve erken dönemde anlatımı başlayan *mir-223* anlatımının olgunlaşma sürecinde en yüksek seviyeye en olgun aşamada ulaştığı ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir.

Mide kanserinde yapılan bir çalışmada, *mir-223* anlatımı metastatik karakterdeki hücrelerde, metastatik olmayanlara kıyasla yüksek bulunmuştur (145). Bizim çalışmamızda, istatistiksel anlamlılık göstermemekle birlikte, *mir-223* anlatımı, MSS metastazı olan hastalarda nispeten düşük tespit edilmiştir. Yeterli materyel ve daha fazla sayıda hasta grubunda incelendiğinde sonuçların değişebileceğini göz önünde bulundurarak diyebiliriz ki, mide kanserindeki durumun aksine *mir-223* anlatımının

MSS metastazı olan T-ALL hastalarında düşük olması, metastazla ilişkili genlerin regülasyonunu etkileyip sürecin engellenebileceğini düşündürmektedir.

Relaps, ALL tedavisinin başarılı olmasını engelleyen en büyük zorluklardan biridir. Yapılan pek çok çalışmaya rağmen pediatrik ALL vakalarında henüz relaps oluşum mekanizması çözülememiştir. Tüm genom dizilimi ile pediatrik ALL vakalarında relapsla ilişkili miRNAların açığa kavuşturulmasını amaçlayan bir çalışmada, mir-223 anlatımının belirgin olarak relaps örneklerinde, tam yanıt gösteren örneklerle kıyasla düşük bulunmuştur. Bu sonuç mir-223'ün relaps süreci ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştü, onkogenik veya ilaç direnci geliştiren bir faktörün mir-223'ün anlatımını etkileyebileceğini ve devamında hastalık seyrinin relaps ile sonuçlanabileceği gerçeğini doğurmuştur. Aynı zamanda mir-223'ün relaps sürecinin önceden tahmin edilebilmesi için bir biobelirteç olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (147). T-ALL hastalarının relaps zamanlarına ait materyal olmadığından, hastaların karşılaştırmalı olarak relaps ve tanı örneklerindeki mir-223 düzeylerini kıyaslama şansımız olmadı. Buna karşın, tanı anı pediatrik T-ALL hasta popülasyonumuzda, hastalık seyrinde relaps bildirilen hastaların relaps gözlenmeyen hastalara kıyasla, mir-223 anlatım seviyelerini düşük olarak tespit ettik. Dolayısıyla relaps gözlenen hastalarda tanı anından itibaren mir-223 seviyesinin düşük olduğu sonucuna varılabilir.

B hücreli KLL de mir-223, prognoz ve hasta ölümü oranları ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur. mir-223 anlatımının yüksek olduğu hastalarda iyi prognoz sürecini takiben, ölüm sayılarının düşmesi, genel sağ kalım oranlarını yükseltmektedir (146). Hasta grubumuzda mir-223'ün yüksek anlatımı ve ölüm oranları arasındaki ilişki beklenildiği üzere B hücreli lösemi ile zıt yönde seyretmektedir. mir-223 anlatımının sağ kalım üzerine etkisini incelemek amacıyla, hasta gen anlatımları ortalamanın altı ve üstü olmak üzere iki grupta toplandı ve hastaların son durumlarına göre Kaplan Meier yaşam analizi uygulandı. mir-223 anlatımının genel sağ kalım ya da relapsız sağ kalımı etkilemediği gözlemlendi. Fakat cox regresyon analizlerinde mir-223'ün artmış anlatımı ve 33.gün yanıtı olmaması, genel sağ kalımı ve relapsız sağ kalımı anlamlı bir şekilde etkilemekteydi. Ayrıca, 33.gün yanıtı olmayan hastalarda 33.gün yanıtı olan hastalara göre mir-223 anlatımları yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla mir-223'ün yüksek anlatımı ve 33.gün yanıtı olmaması T-ALL hastalarında, B-KLL hastalarının aksine kötü prognoz süreci ile ilişkili görülmektedir. Ayrıca önceki çalışmamızda mir-223 sağ kalım

analizlerine paralel olarak, 33.gün yanıtızsızlığı değişkeninin, sağ kalım üzerindeki etkisi hesaplandığında azalmış *SKIL* gen anlatımı ve 33.gün yanıtızsızlığı kötü prognoz süreci ile ilişkilendirilmişti (141). Bu durum relaps sürecine benzer bir şekilde yorumlanabilir; tanı anında mir-223 anlatımının yüksek olması kemoterapik bir dirence yol açmış olabilir ve devamında 33.gün yanıtızsızlığı ile kötü prognozu getirip, hasta sağ kalımlarını düşürebilir. Ayrıca yüksek risk grubundaki hastaların mir-223 anlatımının yüksek olması da 33.gün yanıtızsızlığı ve mir-223 prognostik ilişkisini desteklemektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile;

- i. Pediatrik T-ALL ve sağlıklı timositlerdeki mir-223 anlatım düzeyleri belirlenmiş ve mir-223 anlatımının T-ALL hastalarında kontrollere kıyasla yüksek olduğu tespit edilmiştir.
- ii. mir-223ün anlatımının T hücreli lösemi serilerinde, B hücreli lösemi serilerine göre yüksek olması ve B hücre serilerinde kontrollere kıyasla mir-223 anlatımının düşük olması, fonksiyonunun T hücrelerine spesifik olduğunu göstermektedir.
- iii. mir-223 anlatım seviyeleri, 33.gün yanıtları olmayan hastalarda, olanlara kıyasla yüksektir ve bu sonuç kötü prognoz etkisini desteklemektedir.
- iv. mir-223ün etki mekanizması olarak, T-ALL patogeneğinde önemli rolü olan hedef genlerinin düzenlenmelerini bozarak hastalığa katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.
- v. Bu mekanizmanın kanıtlanabilmesi için yapılacak ileri çalışmalardan biri *SKIL* geninin miRNA bağlanma bölgesi olan 3'UTR bölgesini lusiferaz enzimi içeren bir vektöre klonlayarak, T-ALL hücre serilerinde aktarılmasını takiben; *mir-223* mimik sinyalinin hücrelere verilmesi öncesi ve sonrası oluşması düşünölen mir anlatım seviyesi farklılığını incelemektir.

KAYNAKLAR

- 1.Sun, T., Flow Cytometry and Immunohistochemistry for Hematologic Neoplasms, 1st Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- 2.Hoffbrand A., C.D., Tuddenham E. G. D, Postgraduate Haematology, Fifth Edition. Blackwell Publishing, 2005.
- 3.Kondo, M., et al., Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 11(5): p. 520-6, 2001.
- 4.Lai, A.Y. and M. Kondo, Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*, 203(8): p. 1867-73, 2006.
- 5.Carotta, S. and S.L. Nutt, Losing B cell identity. *Bioessays.*, 30(3): p. 203-7, 2008.
- 6.Landgraf, P. et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007.
- 7.Han YC, Park CY, Bhagat G, Zhang J, Wang Y, Fan JB, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia,*J Exp Med*, 2010.
- 8.Ooi AG, Sahoo D, Adorno M, Wang Y, Weissman IL, Park CY. MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010.
- 9.Liao R, Sun J, Zhang L, Lou G, Chen M, Zhou D, et al. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells. *J Cell Biochem*, 2008.
- 10.Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Hafner M, Scheel H, Mihailovic A, et al. Combined Characterization of microRNA and mRNA Profiles Delineates Early Differentiation Pathways of CD133(+) and CD34(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells*, 2011.
- 11.Jin P, Wang E, Ren J, Childs R, Shin JW, Khuu H, et al. Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis. *J Transl Med*, 2008.
- 12.Merkerova, M.,M. Belickova & H. Bruchova. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur. J. Haematol*, 2008.

13. Kluiver, J. et al. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia*, 2006.
14. MicroRNAs of the immune system Roles in inflammation and cancer, Jan Davidson-Moncada, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923.
15. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 2008.
16. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol*, 2008.
17. Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol*, 1993 May.
18. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2002.
19. Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, Petrie HT. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med*, 2001.
20. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature*, 1994.
21. Kisielow P, von Boehmer H. Development and selection of T cells: facts and puzzles. *Adv Immunol*, 1995.
22. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 2007.
23. Monticelli, S., K. M. Ansel, C. Xiao, N. D. Socci, A. M. Krichevsky, T. H. Thai, N. Rajewsky, D. S. Marks, C. Sander, K. Rajewsky, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol*, 2005.
24. Rodriguez, A., E. Vigorito, S. Clare, M. V. Warren, P. Couttet, D. R. Soond, S. Van Dongen, R. J. Grocock, P. P. Das, E. A. Miska, et al. Requirement of bic/ microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 2007.

- 25.Thai, T. H., D. P. Calado, S. Casola, K. M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, D. Valenzuela, J. L. Kutok, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science*, 2007.
- 26.Navarro F, Lieberman J. Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *J Immunol*, 2010.
- 27.Alberts B L, R.M., Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell*, 4 ed. New York: Garland Science, 2002.
- 28.Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*, 2008.
- 29.Shiffman F, *Hematologic Pathophysiology*. Rhode Island:Lippincott-Raven, 1998.
- 30.S.Sema ANAK ve ark. , *pediatrik hematoloji*, 2011
- 31.Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia, *N Engl J Med*, 2004.
- 32.Myeloid/T-cell acute lymphoblastic leukemia in children and adults, Sabina Chiaretti et al, 2011.
- 33.Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, Downing JR, Gilliland DG, Lander ES, Golub TR, Look AT. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 2002.
- 34.Baer R. TAL1, TAL2 and LYL1. A family of basic helix-loop-helix proteins implicated in T cell acute leukaemia, *Semin Cancer Biol*, 1993.
- 35.Thompson BJ, Buonamici S, Sulis ML, Palomero T, Vilimas T, Basso G, et al. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J Exp Med*, 2007.
- 36.O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*, 2007.
- 37.Flex E, Petrangeli V, Stella L, Chiaretti S, Hornakova T, Knoops L, et al. Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med*, 2008.

38. Jeong EG, Kim MS, Nam HK, Min CK, Lee S, Chung YJ, et al. Somatic mutations of JAK1 and JAK3 in acute leukemias and solid cancers. *Clin Cancer Res*, 2008.
39. Asnafi V, Le Noir S, Lhermitte L, Gardin C, Legrand F, Vallantin X, et al. JAK1 mutations are not frequent events in adult TALL: a GRAALL study. *Br J Haematol*, 2010.
40. Janssen JW, Ludwig WD, Sterry W, Bartram, CR. SIL-TAL1 deletion in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1993.
41. Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Nat Genet*, 2004.
42. De Keersmaecker K, Graux C, Odero MD, Mentens N, Somers R, Maertens J, et al. Fusion of EML1 to ABL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia with cryptic t(9;14)(q34;q32). *Blood*, 2005.
43. Dik WA, Brahim W, Braun C, Braun C, Asnafi V, Dastugue N, et al. CALM-AF10+ T-ALL expression profiles are characterized by overexpression of HOXA and BMI1 oncogenes. *Leukemia*, 2005.
44. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, Lee C, Beverloo HB, van der Spek PJ, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2008.
45. Sulong S, Moorman AV, Irving JA, Strefford JC, Konn ZJ, Case MC, et al. A comprehensive analysis of the CDKN2A gene in childhood acute lymphoblastic leukemia reveals genomic deletion, copy number neutral loss of heterozygosity, and association with specific cytogenetic subgroups. *Blood*, 2009.
46. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer J*. 14(1), 1–6 (2008).
47. Landais, S., Landry, S., Legault, P. & Rassart, E. Oncogenic potential of the miR-106–363 cluster and its implication in human T-cell leukemia. *Cancer Res*, 2007.
48. Mavrakis, K.J. et al. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Cell Biol*, 2010.
49. Konstantinos J Mavrakis et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL), *Nature GeNetics*, 2011.

50. Bousquet M, Harris MH, Zhou B, Lodish HF. MicroRNA miR-125b causes leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010.
51. Mavrakis KJ, Wolfe AL, Oricchio E, Palomero T, de Keersmaecker K, McJunkin K et al. Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol*, 2010.
52. Schotte D, Lange-Turenhout EA, Stumpel DJ, Stam RW, Buijs-Gladdines JG, Meijerink JP et al. Expression of miR-196b is not exclusively MLL-driven but is especially linked to activation of HOXA genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2010.
53. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993.
54. Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, 1998.
55. Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998
56. Colin D. Malone and Gregory J. Hannon. Small RNAs as Guardians of the Genome. *Cell*, 2009.
57. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell*, 2002.
58. Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, 2004.
59. O'Donnell KA, Boeke JD. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders, *Cell*, 2007.
60. V. Narry Kim Small RNAs: Classification, Biogenesis, and Function *Mol. Cells*, Vol. 19, No. 1, pp. 1-15
61. Mattick, J.S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity, *EMBO Rep.*, 2001.
62. Mattick, J.S. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms, *Bioessays*, 2003.

- 63.V.Narry Kim. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes *genesdev*, 2007.
- 64.Song, J.J. et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes, *Nat. Struct. Biol*, 2003.
- 65.Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., and Zhou, M.M. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 426: 468–474. Piwi-interacting RNAs in mammalian testes. *GENES*, 2003.
- 66.Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. Nucleic acid 3' end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol*, 2004.
- 67.Ma, J.B., Ye, K., and Patel, D.J. Structural basis for overhang-small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 2004.
- 68.Rivas, F.V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2005.
- 69.Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., and Hannon, G. J. ,Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 2004.
- 70.Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 2004.
- 71.Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005.
- 72.Christopher L. Holley & Veli K. Topkara An Introduction to Small Non-coding RNAs: miRNA and snoRNA *Cardiovasc Drugs. Ther*, 2011.
- 73.Branislav Kusenda, Marek Mraz, Jiri Mayer, Sarka Pospisilova. MicroRNA BIOGENESIS, FUNCTIONALITY AND CANCER RELEVANCE. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2006.
- 74.Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*, 2007.
- 75.Xiao C, Calado DP, Galler G, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, 2007.

76. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 2007.
77. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009.
78. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 2004.
79. Using Mimics and Inhibitors for microRNA Functional Analysis
<http://www.dharmacon.com/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=2oUd2U7EEO00077-06-D-02-U> 2010.
80. Sontheimer, E.J. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*, 2005.
81. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001.
82. Khvorovova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell*, 2003.
83. Krol J, Krzyzosiak WJ. Structural aspects of microRNA biogenesis, *IUBMB Life*, 2004.
84. Lin SL, Chang D, Ying SY. Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly. *Gene*, 2005.
85. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*, 2008.
86. Julia Winter , Stephanie Jung, Sarina Keller, Richard I. Gregory & Sven Diederichs , Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation *Nature Cell Biology*, 2009.
87. Wu L, Fa J, Belasco GJ. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *PNAS*, 2006.
88. Vasudevan S, Tong Y, Steitz AJ. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs can Up-Regulate Translation. *Science*, 2007.

89. Maciej Ciesla & Klaudia Skrzypek & Magdalena Kozakowska & Agnieszka Loboda & Alicja Jozkowicz & Jozef Dulak. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal Bioanal Chem*, 2011.
90. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, et al. An analysis of human microRNA and disease associations. *Plos ONE*, 2008.
91. Wienholds E, Plasterk HAR. MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters*, 2005.
92. Yazici H, Zipprich J, Peng T, Akisik EZ, Tigli H, Isin M, Akisik EE, Terry MB, Senie RT, Li L, Peng M, Liu Z, Dalay N, Santella RM J. *Oncol*, 2009.
93. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. *Hepatology*, 2008.
94. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. *Oncologist*, 2010.
95. Chen J, Yang T, Yu H, Sun K, Shi Y, Song W, Bai Y, Wang X, Lou K, Song Y, Zhang Y, Hui R. *Hum Mol Genet*, 2010.
96. Nelson PT, Wang WX () *J Alzheimers. Dis*, 2010.
97. Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL, *J Neurosci*, 2008.
98. Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs insight into functions. *Nature Rev. Genet*, 2009.
99. Calin, G. A. et al. Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell* 12, 2007.
100. Rossi, S., Sevignani, C., Nnadi, S. C., Siracusa, L. D. & Calin, G. A. Cancer-associated genomic regions (CAGRs) and noncoding RNAs: bioinformatics and therapeutic implications. *Mamm. Genome* 19, 2008.
101. Clape C, Fritz V, Henriquet C, et al. miR-143 interferes with ERK5 signaling, and abrogates prostate cancer progression in mice. *PLoS ONE*, 2009.
102. Chen X, Guo X, Zhang H, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*, 2009.
103. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis, *Mol Cell*, 2007.

104. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006.
105. Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 2007.
106. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004.
107. Faber J, Gregory RI, Armstrong SA. Linking miRNA regulation to BCR-ABL expression: the next dimension. *Cancer Cell*, 2008.
108. Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*, 2008.
109. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 2008.
110. Pedersen IM, Otero D, Kao E, Miletic AV, Hother C, Ralfkiaer E, Rickert RC, Gronbaek K, David M. Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNF α -dependent growth of B cell lymphomas. *EMBO Mol Med*, 2009.
111. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005.
112. Volinia S, Calin GA et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006.
113. Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatinmodifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 2006.
114. Lujambio A, Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle*, 2009.
115. Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci US*, 2008.

116.Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*, 2006.

117.Chunjuan Dong, Min Ji and Chunyan Ji. MicroRNAs and their potential target genes in leukemia pathogenesis *Cancer Biology & Therapy*, 2009.

118.S. Mi, J. Lu, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2007.

119.Garzon R, Pichiorri F, PalumboT, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 2007.

120.Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia, *Blood* 2008.

121.Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008.

122.Tanner SM, Austin JL, Leone G, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001.

123.Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2005.

124. Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*, 2007.

125.ChaubeyA, Karanti S, Rai D, Oh T, Adhvaryu SG, Aguiar RC. MicroRNAs and deletion of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009.

126.Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, et al. TCL1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000.

127.Marcia Bellon, Yves Lepelletier, Olivier Hermine and Christophe Nicot
Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia *Blood*, 2009.

128.Reinhold MUNKER and George A. CALIN. MicroRNA profiling in cancer. *Clinical Science*, 2011.

129. Fulci V, Scappucci G, et al. miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis." *Hum Immunol*, 2010.
130. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010.
131. Li J, Guo Y, Liang X, Sun M, Wang G, De W, Wu W. MicroRNA-223 functions as an oncogene in human gastric cancer by targeting FBXW7/hCdc4. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012.
132. Yu CH, Xu CF, Li YM. Association of MicroRNA-223 expression with hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci*, 2010.
133. Pearson-White S, McDuffie M. Defective T-cell activation is associated with augmented transforming growth factor Beta sensitivity in mice with mutations in the Sno gene. *Mol Cell Biol*, 2003.
134. Mossalayi MD, Mentz F, Ouaz F, Dalloul AH, Blanc C, Debré P, Ruscetti FW. Early human thymocyte proliferation is regulated by an externally controlled autocrine transforming growth factor-beta 1 mechanism. *Blood*, 1995.
135. Zhu Q, Krakowski AR, Dunham EE, Wang L, Bandyopadhyay A, Berdeaux R, Martin GS, Sun L, Luo K. Dual role of SnoN in mammalian tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, 2007.
136. Pan D, Zhu Q, Luo K. SnoN functions as a tumour suppressor by inducing premature senescence. *EMBO J*, 2009.
137. Shinagawa T, Dong HD, Xu M, Maekawa T, Ishii S. The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J*, 2000.
138. M.C. BÉNÉ on behalf of GEIL (Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies) and EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemias) Pro-T ALL: Immunophenotypical analyses *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2004.
139. Tissot, C. Analysis of miRNA content in total RNA preparations using the Agilent 2100 bioanalyzer, 2008.
140. Erika Varkonyi-Gasic, et al. Hellens Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs *Plant Methods*, 2007.

- 141.Hatırnaz Ng, Ö. T-Hücreli akut lenfoblastik lösemide genom boyu anlatım analizleri. İstanbul üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü, genetik a.b.d. Doktora tezi. İstanbul, 2012.
- 142.Laios A, et al. Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer*, 2008.
143. Xiaohua Li, Ying Zhang, et al. miRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. *Molecular cancer research*, 2011.
144. Sun K, Wang W, Zeng JJ, Wu CT, Lei ST, Li GX. MicroRNA-221 inhibits CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 2011.
- 145.Xiaohua Li, Ying Zhang, Hongwei Zhang, et al. miRNA-223 Promotes Gastric Cancer Invasion and Metastasis by Targeting Tumor Suppressor EPB41L3. *Mol Cancer Res*, 2011.
- 146.Basile Stamatopoulos, Nathalie Meuleman, et al. MicroRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification.
- 147.Bo-Wei Han, Dan-Dan Feng, et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL cited. *Human Molecular Genetics*, 2011.
- 148.Jihong Fu ,Wentao Tang, et al. MicroRNA-mRNA regulatory network in colorectal cancer by a combination of expression profile and bioinformatics analysis. *BMC Systems Biology*, 2012.
- 149.Chen, C. Z., L. Li, H. F. Lodish, D. P. Bartel. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004.

FORMLAR

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU I

Tarih:

Araştırmanın Adı: “T HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARDA MIKRORNA (miRNA) GEN ANLATIMININ TESPİTİ”

Araştırmanın amacı: T hücreli akut lösemi hastalığının oluşum nedenleri araştırılıp, tedavi ve takipte yardımcı olabilecek yeni moleküllere ulaşılması amaçlanmaktadır.

Araştırmanın süresi: Araştırma kapsamında yapılacak olan çalışmanın süresi 18 aydır.

Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı: T hücreli Akut Lösemi tanısı almış 50 gönüllü katılacaktır.

Araştırmada İzlenecek Yöntem: Alınan kan/ilik örneğinden lökosit hücreleriniz ve RNA materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu bankada kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır. Akut lösemilerin tanı ve tedavisinde kullanılan, spesifik translokasyonların rutin tanısı amacıyla alınan kan/kemik iliği materyalinden, çalışma neticesinde, rapor verildikten sonra geriye kalan materyaller çalışma kapsamımıza alınacaktır.

1. Araştırma süresince sizden 1 defaya mahsus kan alınacaktır ve bunun dışında invaziv bir işlem gerçekleştirilmeyecektir.
2. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilemeyebilir.
3. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.
4. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.
5. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.
6. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.
7. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

Kararınızdan önce size verilen bu bilgileri lütfen okuyunuz.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı, İmzası, Görevi

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU II

Tarih:

ÇALIŞMANIN KAPSAMI

1. Yapılması planlanan bu çalışmada sağlıklı kontrol grubu olarak T hücre olgunlaşmasının gerçekleştiği yer olan timus dokusu kullanılacaktır. Timus yaşla birlikte gerileyen bir organdır. Yenidoğan ve adolesan öncesi dönemlerde büyük ve aktif olup, gençlik yıllarının başında körelip, işlevini kaybetmektedir.

Kalp-damar cerrahisi ameliyatlarında bölgenin daha iyi görülebilmesi için timus dokusunun 3/2'sinin çıkarılma zorunluluğu vardır. Bu doku normalde ameliyat sırasında atıl doku olarak çöpe atılmaktadır. Çıkarılan bu doku sizin sağlığımızla ilgili herhangi başka ileri çalışmada kullanılmayacağı gibi yokluğu sağlığınıza olumsuz yönde etkilemeyecektir.

2.Çalışmanın deneysel kısmı İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilecektir.

3.Cerrahi operasyon sırasında çıkarılan timus örneğinden T hücre alt grupları elde edilecektir ve **“T HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARDA MIKRORNA (miRNA) GEN ANLATIMININ TESPİTİ”** adlı çalışmada sağlıklı kontrol grubu olarak kullanılacaktır. Oluşturulan bu kontrol grubunda kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

4. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

5. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.

6. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.

7. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.

Kararınızdan önce size verilen bu bilgileri lütfen okuyunuz.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı-soyadı, İmzası, Görevi

HASTA TAKİP FORMU

Tarih:

Projenin Adı: “**T HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ HASTALARDA MIKRORNA (miRNA) GEN ANLATIMININ TESPİTİ**”

Hasta Bilgileri

Adı ve Soyadı :

Doğum Tarihi:

TC Kimlik No:

Tanı Yaşı:

Cinsiyeti:

Materyal:

Gönderen Doktor:Aile Öyküsü:Tam Kan Sayımı:

WBC

RBC

Plt

HB

HCT

Detaylı İmmüfenotip:Blast Yüzdesi:Hasta Tedavi Protokolü:

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ceren	Soyadı	Öztunç
Doğ.Yeri	Altındağ	Doğ.Tar.	08/07/1987
Uyruğu	TC	TC Kim No	13825293014
Email		Tel	0536 228 09 72

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik	2012
Lisans	İ.Ü.Fen Fakültesi,Biyoloji	2009
Lise	Ö.Ç Bilfen Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi	ÜDS	74

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	79	76	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Sinem Firtina , Muge Sayitoglu, Ozden Hatirnaz, Yucel Erbilgin, **Ceren Oztunc**, Suzan Cinar, Inci Yildiz , Tiraje Celkan, Sema Anak, Aysegul Unuvar, Omer Devecioglu, Cetin Timur, Gonul Aydogan, Arzu Akcay, Didem Atay, Emine Turkkkan, Serap Karaman, Betul Orhaner, Nazan Sarper, Gunnur Deniz, Ugur Ozbek, Evaluation of PAX5 gene in the early stages of leukemic B cells in the childhood B cell acute lymphoblastic leukemia, Leukemia Research, 2011

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Karakalem, Tango, Voleybol, Yüzme