

← 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)

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA
WNT SİNYAL YOLAĞI YENİ NESİL RNA DİZİLEME
ANALİZLERİ**

EDA GÜNGÖRÜRLER

**DANIŞMAN
PROF. DR. MÜGE SAYITOĞLU**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Eda GÜNGÖRÜRLER tarafından Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan "Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Hatlarında Wnt Sinyal Yolağı Yeni Nesil RNA Dizileme Analizleri" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 09.08.2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı



Doç. Dr. Veysel Sabri HANÇER
İstinye Üni. Tıp Fakültesi
Genetik Anabilim Dalı

BEYAN**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.

Eda Güngörürler



İTHAF

Sevgili aileme; eşim, annem, abim ve küçük kızımıza ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Danışmanım sayın Prof. Dr. Müge Sayitoğlu'na yüksek lisans eğitimimin başından beri beni her noktada desteklediği için çok teşekkür ederim. Kendisinin yardımları ve desteğiyle bugün bu noktaya gelebildim. Ayrıca çalışmalarım boyunca yaptıkları yorumlarla kendimi daha geliştirmemi sağlayan sayın Dr. Özden HATırnaz NG, Sinem Fırtına ve Khusan Khodzhaev'e çok teşekkür ederim.

Korkulu rüya olabilecek kadar problemlili analizleri çok kolaymış gibi anlatıp beni rahatlatan, günün hangi saati olursa olsun yardımcı olmaya çalışan Haluk Doğan'a, Zeynep Hakgüder'e ; bana laboratuvarında kendimi geliştirme fırsatını sunup tez çalışmamda kullanacağım analizleri öğrenmeme fırsat veren Prof. Dr. Hasan Otu'ya çok teşekkür ederim.

Bu yolculuk ailemin desteği olmadan mümkün olamazdı. Hayallarımın peşinden gitmemi desteklediğiniz ve cesaretlendirdiğiniz için sizlere çok teşekkür ederim. Özellikle her sıkıştığım noktada beni doğruya yönelten ve duygusal yardımlarını esirgemeyen annem Tijen Höyük ve aramızda mesafeler olsa da benimle ilgilenmeyi hiçbir zaman ihmal etmeyen, sesini her duyduğumda neşemi yerine getiren canım abim Selim Güngörürler sizlere çok teşekkür ederim.

Son olarak, sevgili eşim Yavuz Alp Sun, seni tanıdığım ilk andan itibaren yanındayken yüzümdeki gülümseme eksik olmadı. Tüm desteğin ve sevgin için çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2016-20440.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Hematopoez	2
2.1.1. T Hücre Gelişimi.....	2
2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi / Lenfoblastik Lenfoma.....	4
2.2.1. T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi / Lenfoblastik Lenfoma	4
2.2.2. T-ALL'de Görülen Moleküler Değişiklikler	4
2.2.3. Gen Anlatımı (Yazılım)	6
2.2.4. miRNA'ların Gen Anlatımı Üzerindeki Önemi.....	7
2.3. WNT Sinyal Yolağı	8
2.3.1. Kanonik WNT Yolağı.....	9
2.3.2. Kanonik Olmayan WNT Sinyal Yolakları.....	10
2.4. Yeni Nesil Dizileme.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Hücre Hatları.....	15
3.1.2. Hasta Verileri	15
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	16

3.1.4. Kullanılan Kitler	16
3.1.5. Kullanılan Cihazlar	16
3.1.6. Kullanılan Veri Tabanlarının Listesi.....	17
3.1.7. Kullanılan Analiz Programlarının Listesi	18
3.2. Yöntemler	20
3.2.1. Hücre Kültürü	21
3.2.2. Hücre Serilerinde β -Kateninin Uyarılması	21
3.2.3. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu.....	21
3.2.4. cDNA Sentezi	22
3.2.5. Kantitatif PZT	23
3.2.6. RNA Kalite Kontrolü.....	25
3.2.7. Yeni Nesil RNA Dizileme	25
3.2.8. Biyoenformatik Analizler	27
3.2.8.1. Kalite Kontrol ve Temizleme.....	27
3.2.8.2. Dizileme Verilerinin Kalite Kontrolü	27
3.2.8.3. Referans Genoma Hizalanması ve Gen Anlatımlarının Profillendirilmesi..	27
3.2.8.4. Gen Anlatım Analizi	28
3.2.8.5. Tüm Transkriptom Analiz.....	29
3.2.8.6. Gen Anlatım Analizi	30
3.2.8.7. Alternatif Kırılma Ürünleri	30
3.2.8.8. Varyant Analizleri.....	30
3.2.8.9. miRNA Analizleri	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. WNT yolağının aktivasyonu ve validasyonu	31
4.1.1. RNA Kalite Kontrolü.....	31
4.1.2. Kantitatif PZT	32
4.2. Enformatik Bulgular	33
4.2.1. Ön İşleme	33
4.2.1.1. Kalite Kontrol ve Temizleme.....	33
4.2.2. Referans Genoma Hizalanması ve Gen Anlatımlarının Profillendirilmesi.....	34
4.2.3. Gen Anlatım Analizi	34
4.2.4. Tüm Transkriptom Analiz.....	36
4.2.5. WNT Yolağı Özelinde Gen Anlatım Analizi.....	41

4.2.6. Alternatif Kırpılma Ürünleri	46
4.2.7. miRNA Analizleri	47
4.2.8. Varyant Analizleri.....	50
5. TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR	60
FORMLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	65



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. ALL'nin tanısı ve ayırıcı tanısında kullanılacak miRNA'lar (22).	8
Tablo 2. Seçilen hücre hatların hücre yüzeylerinde ifade edilen belirteçler.....	15
Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar.....	16
Tablo 4. Kullanılan Kitler.....	16
Tablo 5. Kullanılan Cihazlar.....	17
Tablo 6. Kullanılan Veri Tabanlarının Listesi	17
Tablo 7. Kullanılan Analiz Programlarının Listesi.....	18
Tablo 8. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımının koşulları	23
Tablo 9: Kantitatif PZT reaksiyon karışımı içeriği.....	24
Tablo 10: Kantitatif PZT protokolü.....	24
Tablo 11. Gen anlatımındaki değişimlerin üçlü olarak çalışılan sayımsal PZT sonuçlarının P-değerleri.....	33
Tablo 12: Uyarılmış hücre hatları ve hasta grubunda ortak anlatımı değişen WNT genlerinin dahil oldukları diğer yolaklar.	37
Tablo 13: Uyarılmış hücre hatları ve hastalarda ortak çıkan genlerden en anlamlı artışı ve azalışı gösteren 10 gen.	40
Tablo 14: WNT yolağı özelinde yapılan gen analizinde anlatımı değişen genler ve değişim katsayıları ($p < 0.05$).	42
Tablo 15: Uyarılmış hücre hatları ve hasta grubunda ortak anlatımı değişen WNT genlerinin dahil oldukları diğer yolaklar.	43
Tablo 16. Uyarılmış hücre hatları ve hastalarda ortak çıkan Wnt yolağı genlerinin dahil oldukları yolaklar.....	45
Tablo 17: Anlatımı değişen miRNA'lar ve değişim katsayıları.	48
Tablo 18: Anlatımı değişen miRNA'lar ve değişim katsayıları.	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Multipotent hematopoetik kök hücreden köken alan kan hücrelerinin oluşumunu gösteren şema.....	2
Şekil 2: Öncül hücrelerin kemik iliğinden timusa göç etmesi ve timusun farklı lobüllerinde gerçekleşen T hücre gelişim basamakları.....	3
Şekil 3: Hücre yüzey belirteçlerine göre T hücre gelişim basamakları.....	4
Şekil 4. Kromozomal translokasyon ile oluşan yeni protein.....	5
Şekil 5. Kodlayan ve kodlmayan RNA moleküllerinin sınıflandırılması.....	7
Şekil 6. A) Aktif olmayan ve B) olan Wnt sinyal yolları (24).....	9
Şekil 7. Kanonik olmayan Wnt sinyal yolları. A) Hücre polaritesinin düzenlenmesinde rol oynayan, B) WNT/Ca ²⁺ sinyal yolağı (24).....	11
Şekil 8: Uygulanan yöntemlerin iş akış şeması.....	20
Şekil 9. LiCl etkilediği yollar.....	21
Şekil 10: Hücre hatlarının LiCl ile muamelesi ve muamele sonunda toplanan hücrelerden RNA eldesi.....	22
Şekil 11: RNA-Dizileme kümeleme (36).....	26
Şekil 12: RNA-Dizileme SBS dizileme (36).....	26
Şekil 13. İlgili gen için okuma derinliği ve gen uzunluğuna göre normalize edilmemiş (öncesi) ve edilmiş (sonrası) değerlerin temsili olarak gösterimi. Farklı sayıdaki okuma değerine sahip olan farklı uzunluktaki genlerin aslında aynı gen anlatım profilini gösterebileceğini göstermek için değerler temsili olarak gösterilmiştir.....	28
Şekil 14. R Studio'nun kullanıcı ara yüzü.....	29
Şekil 15: RNA örneklerinin Biyoanalizör cihazındaki ölçüm sonuçları. A) çipli sisteme yüklenmiş örneklerin jel görüntüsü. B) 28S/18S oranının hesaplanabilmesi için gerekli okuma değerlerinin grafikleri.....	31
Şekil 16. LiCl muamelesinin sonrasında <i>AXIN2</i> , <i>CTNNB1</i> ve <i>LEF1</i> genlerinin anlatımlarını gösteren kantitatif PZR sonuçları.....	32
Şekil 17: Dizilenmiş RNA örneklerinin okumaları için gerçekleştirilmiş kalite kontrol analizi sonucu. Sarı barlarda gösterilen her bir fragmanın okuma kaliteleri buldukları alanlarda belirtilmiştir. Yeşil alan; kaliteli okuma, sarı ve kırmızı alanlar ise dizilerde kalan adaptörler veya kısa okumalar olduğunu işaret etmektedir.....	34

Şekil 18: Farklı araçlarla hizalanmış ve gen anlatım profilleri hesaplanmış örneklere genel bakış.	35
Şekil 19: Gen anlatım analizleri akış şeması. Yeşil ile gösterilen hizalama araçları ve hesaplama metodları ile devam edilmiştir.	36
Şekil 20: Tüm transkriptom analizinde, gen anlatım ısı grafiği.	37
Şekil 21: Hasta verilerinde, tüm transkriptom analizinin gen anlatım ısı grafiği. . “H” kodları hasta örnekleri, “THY” kodları kontrol timus havuzunu temsil etmektedir.	39
Şekil 22: Tüm transkriptom analizi sonucu, LiCl ile muamele edilmiş hücre hattı ve hastalardaki gen anlatım profillerinin kesişim kümesi (n=426).	40
Şekil 23. WNT yolağı özelinde yapılan gen analizinde ısı grafiği.	41
Şekil 24: WNT yolağı özelinde yapılan gen analizinde ısı grafiği.	44
Şekil 25: WNT yolağı özelinde yapılan analiz sonucu, LiCl ile muamele edilmiş hücre hattı ve hastalardaki gen anlatım profillerinin kesişim kümesi (n=8).	45
Şekil 26: <i>CTNNB1</i> için alternatif kırılma ürünlerinin örneklere göre değişen anlatım düzeyleri. NCBI veritabanında <i>CTNNB1</i> için tanımlanmış alternatif kırılma ürünleri ve boyutları gösterilmiştir. <i>CTNNB1</i> NM_001904, NM_001098210 ve NM_001098209 ürünlerinin örneklere göre değişen anlatım düzeyleri. Kırmızı semboller uyarılmış hücre hatlarını, yeşiller hastaları ve maviler de control örneklerini temsil etmektedir.	46
Şekil 27: <i>LEF1</i> için alternatif kırılma ürünlerinin örneklere göre değişen anlatım düzeyleri. NCBI veritabanında <i>LEF1</i> için tanımlanmış alternatif kırılma ürünleri ve boyutları gösterilmiştir. NM_001166119 ve NM_001130713 ürünlerinin örneklere göre değişen anlatım düzeyleri. Kırmızı semboller uyarılmış hücre hatlarını, yeşiller hastaları ve maviler de control örneklerini temsil etmektedir.	47
Şekil 28: miRNA analizinde anlatım farklılığı gösteren miRNA’larının ısı haritası.	48
Şekil 29: A) Jurkat hattında <i>CDK4</i> ve <i>ARF1</i> varyantının gösterimi. B) Lösemiler için bilinen varyantların Jurkat hücre hattında gösterimi. C) T hücre için bilinen varyantların Jurkat hücre hattında gösterimi. D) WNT yolağıdaki genlerde tespit edilen varyantlar.	52
Şekil 30: A) Molt4 hücre hattında <i>NRAS</i> ve <i>ARF1</i> varyantının gösterimi. B) Lösemiler için bilinen varyantların Molt4 hücre hattında gösterimi. C) T hücre için bilinen varyantların Molt4 hücre hattında gösterimi. D) WNT yolağıdaki genlerde tespit edilen varyantlar.	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

T-ALL: T hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

HKH: Hematopoetik Kök Hücre

ÇN: Çift Negatif

ÇP: Çift Pozitif

TP: Tek Pozitif

RNA: Ribonükleik Asit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

TF: Yazılım Faktörleri (Transcription factors)

YND: Yeni Nesil Dizilemenin

Kb: Kilobazdan

Gb: Gigabazdan

miRNA: Mikro RNA

mRNA: Mesajcı RNA

UPL: Evrensel prob kütüphanesi (“Universal Probe Library”)

kPZT: Kantitatif Polimeraz Zincir Tepkimesi

FTP: Dosya aktarım iletişim kuralı

FastQC: Fasta Kalite Kontrol “(Fasta Quality Control”)

FPKM: Fragman başına düşen okuma sayısı (“Fragment Per Kilobase Per Million”)

ÖZET

Güngörürler, Eda. (2017). Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Hatlarında Wnt Sinyal Yolağı Yeni Nesil RNA Dizileme Analizleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut lenfoblastik lösemi, B ve T lenfosit gelişiminin erken safhasında meydana gelen somatik genetik değişiklikler ve gen anlatımlarının deregüle olması ile ortaya çıkan ve lenfositlerin aşırı artışı ile sonuçlanan bir lösemi tipidir. T-ALL hastaları için prognostik öneme sahip ve hastalığın takibinde kullanılacak güvenilir bir genetik belirteç bulunmamakla birlikte, doğrudan tedavi protokolünü ve tedavide yararlanılacak yeni hedef proteinleri belirlemede esas olacak moleküler alt yapı ve sınıflandırma da bilinmemektedir.

Bu çalışma ile yeni nesil transkriptom (RNA) dizileme ile LiCl kullanılarak WNT yolağı aktive edilmiş Jurkat ve Molt4 hücre hatlarının dizilenmesi ve kötü prognoza sebep olduğu daha önceki çalışmalarımızla gösterilen WNT yolağının hedef genlerinin anlatım analizlerini gerçekleştirilmiştir. Böylece, LiCl muamelesi ile WNT yolağı aktive olmuş ALL hücre hatları, seçtiğimiz uygun kontroller ve açık veritabanlarından elde ettiğimiz T-ALL hasta örnekleri ile (GSE49601) karşılaştırılıp kötü prognozda olası rolü olan genler araştırılmıştır.

Analizlerimiz sonucunda, WNT yolağında görevli genlerin anlatım düzeylerindeki değişimler ve bu genler içinde kritik önemi bulunun *LEF1*'in alternatif kırılma varyantlarından onkogenik özellikte olan ürününün uyarılmış hücre hatlarında ve hastalarda anlatımın arttığı gösterilmiştir. Ayrıca anlamlı olarak anlatımının değiştiğini gösterdiğimiz mir-1296-5p miRNA'sının hastalık modelimiz için tümör baskılayıcı terapötik olabileceğini düşünmekteyiz.

Elde ettiğimiz moleküler bulgulara ek olarak, çalışmadaki amaçlarımızdan biri de iş akışı ve yorumlaması zor olan transkriptom datasının analiz algoritmasını oturtulması hedeflenmiş ve literatürde tanımlanmış verilerin konfirmasyonu ile uygulanan analiz algoritmasının doğruluğunu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler : RNA-Dizileme, Yeni nesil dizileme, Akut lenfoblastik lösemi, Wnt Yolağı.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2016-20440.

ABSTRACT

Güngörürler, Eda. (2017). Next Generation RNA Sequencing Analysis of WNT Pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul.

WNT signaling takes part in the development of T and B cells that derive from hematopoietic stem cells. T-ALL is one of the most aggressive and treatment resistant form of leukemia. Our group previously detected abnormal activation of WNT signaling in acute leukemia patients. There is no reliable genetic modification for T-ALL patients with prognostic screening and follow-up of the disease. The molecular basis and classification to determine the direct treatment protocol and the new target proteins to be used in treatment are also unknown.

In our work, we selected two different T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) cell lines, Jurkat and Molt4, that shows different stages of disease. We stimulate WNT pathway with LiCl of these cell lines, we have selected suitable control samples and we have acquired patient samples from open sources database (GEO49601). In this group, we aimed to investigate genes that play a role in poor prognosis. Expression of alternative splicing variant of *LEF1* which have oncogenic property, increased in patients and stimulated cell lines. Additionally, we believe that mir-1296-5p, which we have shown to be significantly altered in expression, may be tumor suppressor therapeutic for our disease model.

Over and above to these molecular findings that we have achieved, one of our goals in this study was to develop an algorithm of transcriptomic data, which is difficult to work with and to interpret, and showed the correctness of our algorithm by confirming the data described in the literature.

Key Words: RNA-Sequencing, Next Generation Sequencing, Acute lymphoblastic leukemia, Wnt Pathway.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: TYL-2016-20440.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hematopoez; hematopoetik kök hücrelerden tüm farklı kan hücrelerinin yapım sürecidir. Bu süreçte kanser yolaklarının anormal aktivasyonundan etkilenen öncül hücrelerin farklılaşması bloke olur ve olgunlaşmamış hücrelerin aşırı proliferasyonu sonucu lösemi oluşumu gözlemlenir. Akut lenfoblastik lösemi (ALL); lenfoid ya da miyeloid öncül hücrelerde meydana gelen genetik ve epigenetik varyasyonlar veya kanser yolaklarının ektopik aktivasyonu ve kemik iliğinde olgunlaşmamış kanser hücrelerinin (blast) birikimi ile karakterizedir (1). ALL hızlı seyirli olup, çocukluk çağında en sık görülen kanser tipidir. Hastalığın çocuklardaki prevalansı 9-10/100000 iken erişkin yaş grubunda prevalans değeri 1-2/100000'e gerilemektedir. Pediatrik ALL vakaların yaklaşık %85'ini B-ALL, %15'ini de T hücreli-ALL (T-ALL) oluşturmaktadır.

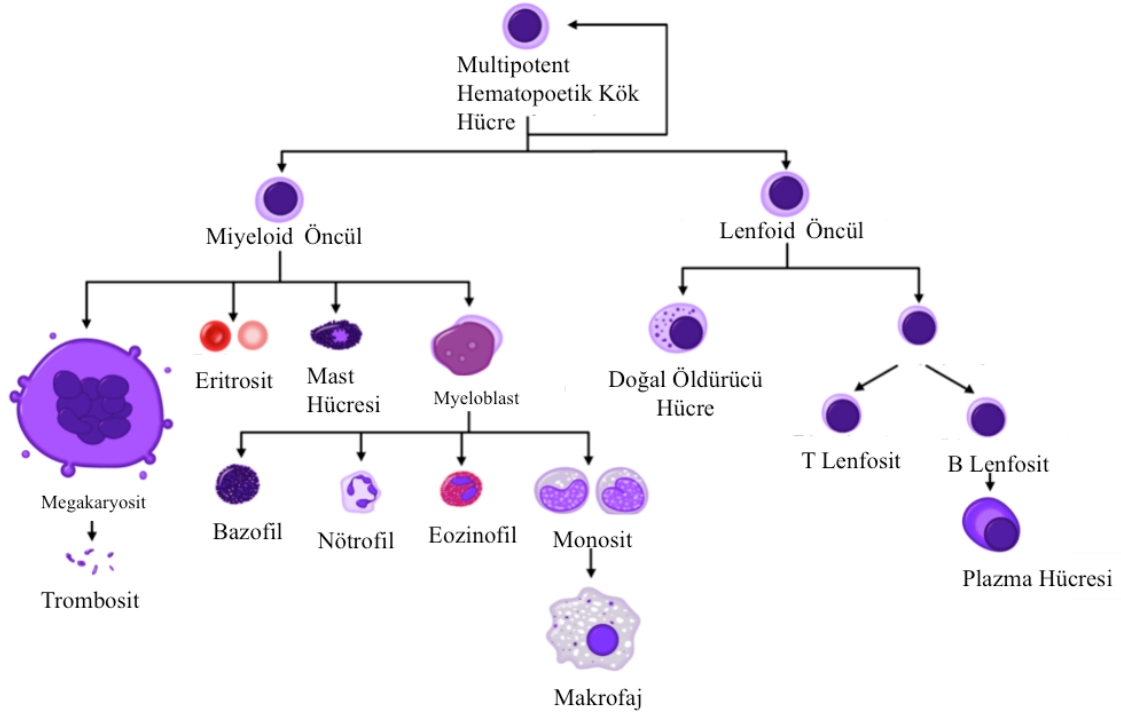
Evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş olan sinyal iletim yolaklarından olan ve ilk olarak *Drosophila*'da keşfedilmiş olan WNT sinyal iletim yolağı, hematopoetik kök hücreler ile gelişmekte olan T ve B lenfositlerinin olgunlaşma sürecinde rol oynamaktadır. WNT proteinleri gelişim sürecindeki hücrelerin akıbetini, yaşamını, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenleyen ve embriyonik dönemde açık olan bir yolaktır (2). WNT sinyal yolağındaki kilit rolü olan molekül sitoplazmik protein olan β -*katenin*dir. WNT sinyalinin noksanlığı durumunda, β -*katenin* sitoplazmik bir yıkım kompleksiyle sürekli olarak fosforillenir ve degrades edilir. Ancak, β -*katenin*'in Frizzled ailesi reseptör kompleksine bağlanmasıyla beraber fosforillenmez ve bununla beraber birikimi ile aktivasyonuna neden olur (3). Sitoplazmada yer alan β -*katenin* yer değiştirerek hücre çekirdeğine geçer ve *Tcf/Lef* transkripsiyon faktörlerini aktifleştirir (4,5). Önceki çalışmalarda ALL hastalarında anormal WNT/ β -*katenin* yolak aktivasyonu ve lösemi hastalarında bu yolağa ait genetik ve epigenetik varyasyonların varlığı gösterilmiştir (6,7).

Bu tez projesi kapsamında, WNT yolağı aktive edilmiş ve edilmemiş T-ALL hücre serilerinde RNA dizileme gerçekleştirilmiş ve WNT yolağında görev yapan transkriptlerin anlatım düzeyleri, varyasyonlar ve küçük RNA'lar incelenmiştir. WNT yolağı uyarılmış T-ALL hücre serilerinde gen anlatım düzeylerindeki muhtemel değişikliklerin T-ALL patogenezinde/prognozunda muhtemel bir rolü olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

Hematopoez, kan hücrelerinin oluşumunu, gelişimini ve farklılaşma sürecini ifade eder. Bir diğer deyişle, Hematopoetik Kök Hücre (HKH)'lerin farklılaşarak kan hücrelerinin oluştuğu bir süreçtir (Şekil 1).

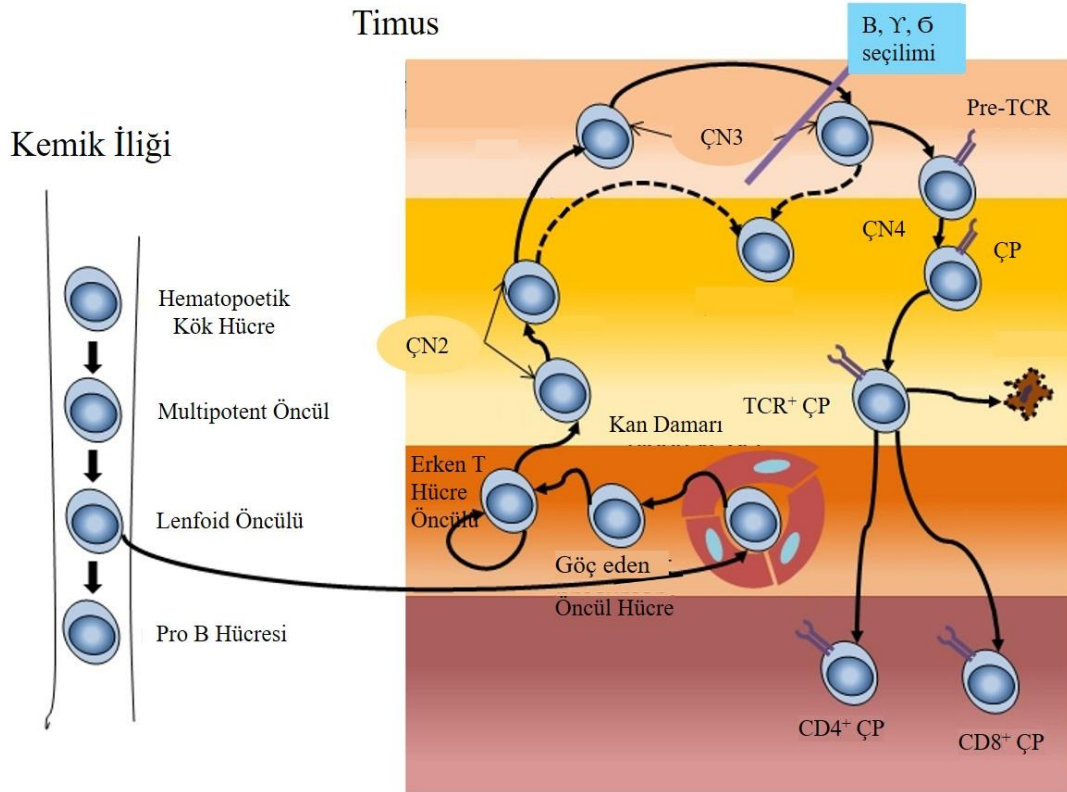


Şekil 1. Multipotent hematopoetik kök hücreden köken alan kan hücrelerinin oluşumunu gösteren şema.

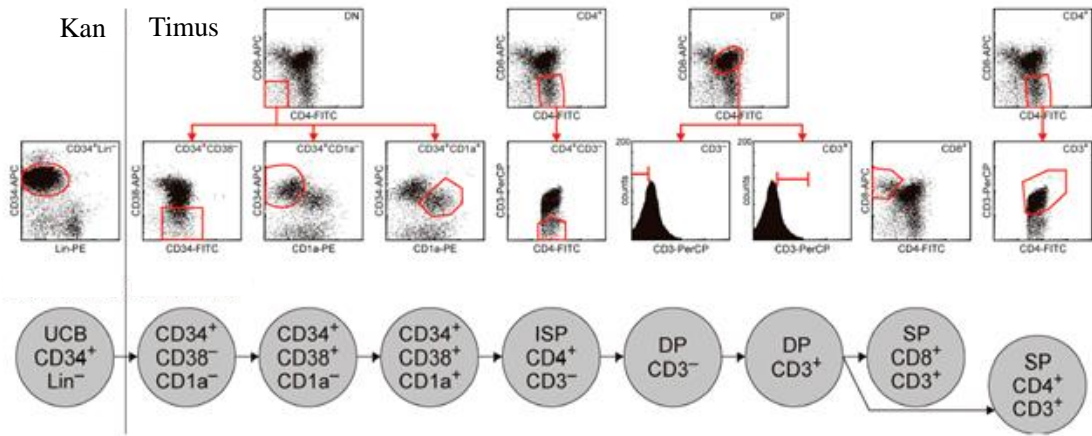
2.1.1. T Hücre Gelişimi

T lenfositlerin öncülleri, pluripotent kök hücre özelliğindeki hematopoetik kök hücreler tarafından kemik iliğinde ortaya çıkmaktadır. Bu öncüller farklılaşarak multipotent özellikli lenfoid öncüllerini oluştururlar. Bu lenfoid öncüllerinden fenotipik olarak erken T hücre öncüllerine benzeyenler kan yoluyla timusa göç ederler (8,9). Bu göç eden öncül hücrelere aynı zamanda çift negatif 1 (ÇN1) de denir. ÇN1 hücreler yüzey belirteçleri açısından $CD3^+CD4^-CD8^-CD25^-CD44^-KIT^+$ fenotipini gösteren hücrelerdir (Şekil 2). T hücre gelişimi sürecinde hücreler ÇN1'i takiben çift negatif 2 (ÇN2), çift negatif 3 (ÇN3) ve çift negatif 4 (ÇN4) evrelerini takip ederler. Bu süreç, c-KIT reseptörünün azalarak düzenlenmesiyle başlayıp $CD4^-CD8^-CD25^+CD44^-$

fenotipindeki ÇN2 hücreler oluşur. Bir sonraki adımda, CD44 yüzey belirtecinin kalkmasıyla CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44⁻ fenotipindeki ÇN3 hücreler oluşur. Son adımda, CD25 yüzey molekülünün kaybıyla CD4⁻CD8⁻CD25⁻CD44⁻ ÇN4 hücreler oluşur (8), (10,11) (Şekil 3). Erken T hücre öncüllerinden ÇN4 hücrelerine kadar olan bu farklılaşma sırasında Notch ligandlarını, gerekli büyüme faktörlerini ve T hücre gelişiminde önemli olan morfojenler, ifade eden stromal hücrelerle timus içerisinde temasta bulunurlar. ÇN4 hücreler, CD4⁺CD8⁺ yüzey belirteçlerine sahip çift pozitif (ÇP) hücelere dönüşmeden önce, Notch ligandlarına, interlökin-7 ve Shh proteinine olan bağımlılıklarını yitirirler (12). Hücreler ÇP evresine geldiklerinde, pozitif ve negatif seçilime uğrarlar. Seçilimin ardından $\alpha\beta$ T hücre reseptörü (TCR)⁺ olan T hücreleri bağışıklık işlevlerini sergilemek için timustan ikincil lenfoid organlara göç ederler. Bu göç eden olgunlaşmış hücelere tek pozitif (TP) hücelere denir ve fenotipik olarak ya CD4⁺ yada CD8⁺ yüzey belirteçlerine sahiplerdir.



Şekil 2: Öncül hücrelerin kemik iliğinden timusa göç etmesi ve timusun farklı lobüllerinde gerçekleşen T hücre gelişim basamakları.



Şekil 3: Hücre yüzey belirteçlerine göre T hücre gelişim basamakları.

2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi / Lenfoblastik Lenfoma

Akut lösemilerin en belirgin patolojik özelliği kemik iliğinde ve diğer dokularda farklılaşmamış blastların birikmesidir ve bu durum akut lösemilerde farklılaşmayı engelleyen veyananamlı derecede geciktiren bozukluklar olduğunu işaret eder.

Akut lenfoblastik lösemi ve lenfoblastik lenfomada (ALL) kontrolsüz çoğalan lenfoid hücrelere *lenfoblast* denir. ALL kemik iliği ve periferik kanda tutulum gösterirken, lenfoblastik lenfoma kemik veya yumuşak dokuda tutulum gösterir. Bu klinik değişkenliğin sebebi, kısmen tümörün kökeni ile ilişkilidir. B hücreli tümörler çoğunlukla B hücrelerin gelişim gösterdiği kemik iliğinde tutulum gösterirken, T hücreli tümörler T hücrelerin gelişim gösterdiği timusta ortaya çıkar.

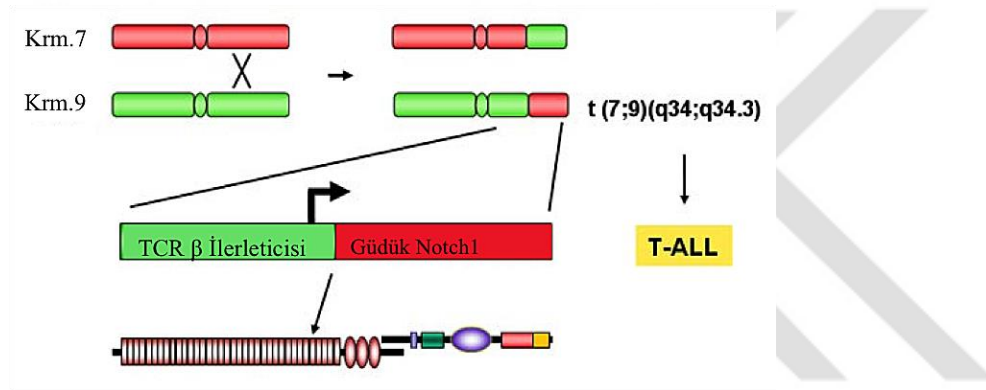
2.2.1. T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi / Lenfoblastik Lenfoma

T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), timositlerin gelişim evresinin herhangi bir evresinde anormal birikimi ile oluşan bir hastalıktır. Tüm ALL'ler içerisinde T-ALL'ler %15'ine denk gelir. Tüm T-ALL vakalarının %10-15'i pediatrik, %25'i yetişkin vakalardır (13).

2.2.2. T-ALL'de Görülen Moleküler Değişiklikler

Birçok moleküler değişiklikler T-ALL'nin morfogenezinde rol oynar. Özetlemek gerekirse bu moleküler değişiklikler; kromozomal bozukluklar, gen varyasyonları, gen ekspresyon profilleri ve epigenetik değişimler olmak üzere 4 farklı grup altında toplanabilir.

Kromozomal translokasyonlar; genlerin ve moleküler mekanizmaların fonksiyonunu değiştirirler. T-hücre gelişiminde rol oynayan genler ve mekanizmalar üzerinde etki gösterdiklerinde sitogenetik tekniklerle tespit edilebilen grup olan kromozomal anomali ile oluşmuş T-ALL grubunu oluştururlar. Bu grup, T-ALL'lerin yaklaşık olarak %50'sine tekabül etmektedir. T-hücre gelişimine etki eden ve bu grup içinde en çok dikkat çeken kromozomal anomaliler 2 temel grup vardır, bunlardan ilki promotör veya enhancer gibi gen düzenleyici etkisi yüksek bölgelerin yeniden yerlerinin düzenlenmesiyle oluşan bir anomalidir. Diğer grupta ise, oluşan translokasyon, füzyon proteinle sonuçlanmaktadır. Genellikle, bu füzyon proteinleri hücre döngüsünü etkileyen bir *novel* protein oluşturmaktadır (Şekil 4) (14).



Şekil 4. Kromozomal translokasyon ile oluşan yeni protein.

Gen Varyasyonları; T-ALL patogenezi ile ilişkilendirilmiş ve sitogenetik olarak tespit edilemeyen varyasyonlar, gen varyasyonları grubunu oluşturmaktadır. En sık rastalanan gen varyasyonlarından bazıları *NOTCH1*, *FBXW7*, *PTEN*, *CDKN2A/B*, *CDKN1B*, *6q15-16.1*, *PHF6*, *WT1*, *LEF1*, *JAK1*, *IL7R*, *FLT3*, *NRAS*, *BCL11B* ve *PTPN2*'dir.

Gen Anlatımı Profilleri; mikrodizileme tabanlı çalışmalar sonucunda, T-ALL olguları timosit farklılaşmasının farklı evrelerinde lösemik areste karşılık gelen 3 temel alt gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan ilki *HOXA/MEISI*, *TLX1-3* ve *TALI*'in aşırı anlatımını temsil eden altgrup (15), ikinci grup *LEF1*'in inaktif olduğu alt grup (16) ve son olarak 3. grup ise erken T-hücre öncüllerinin fenotipi gösteren alt gruptur (17). ÇN2 hücrelerindeki lösemik arest, *LYL1* geninin yüksek düzeylerde anlatımıyla karakterizedir. ÇN3 hücrelerindeki arest, *HOX11/TLX1* anlatımındaki değişikliklerle karakterizedir. ÇP hücrelerindeki ise arest, *TALI/LMO1* anlatımındaki değişimle karakterizedir.

Epigenetik Değişimler: tüm kanserlerde, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarındaki anormal değişikliklere sık rastlanır. T hücre lökemogenezinde de epigenetik modifikasyonlar önemli noktadadır. Özellikle T hücre lökemogenezine ilişkilendirilmiş epigenetik değişimler; PRC2 genindeki histon modifikasyonu (18) ve tümörögenез için kritik olan genlerdeki CpG adacıklarındaki metilasyonlar (19) dikkat çekmektedir.

2.2.3. Gen Anlatımı (Yazılım)

Ribonükleik asit (RNA), nükleotidlerden oluşmuş, katlanarak kompleks yapılaraya dönüşebilen, tek zincirden meydana gelene bir nükleik asittir. RNA molekülü; uzun, dalsız, 3'-5' fosfodiester bağları ile birbirine bağlanmış dört çeşit ribonükleotidden meydana gelir. Deoksiribonükleik asitte (DNA) saklanan genetik veri, işlevsel kopya olarak tanımlanan RNA yapımı ile işlevsel ürüne döner. RNA yapımında yazılım, RNA'nın olgunlaştırılması ve protein biyogenezini basamaklarından oluşmaktadır. RNA yazılımında RNA polimeraz enzimi ile yazılım faktörleri (TF) olarak tanımlanan proteinler görev alır.

Enzimatik yol ile DNA'nın bir ipliğinin kalıp olarak alınmasıyla RNA'nın sentezlenmesidir. RNA sentezi, RNA polimeraz enzimi tarafından katalizlenir. RNA polimeraz primere ihtiyaç duymadan sentezi bir DNA kalıbı tarafından verilen komut ile sentezi başlatır. Komut veren bu özel DNA kalıbına promotör denir.

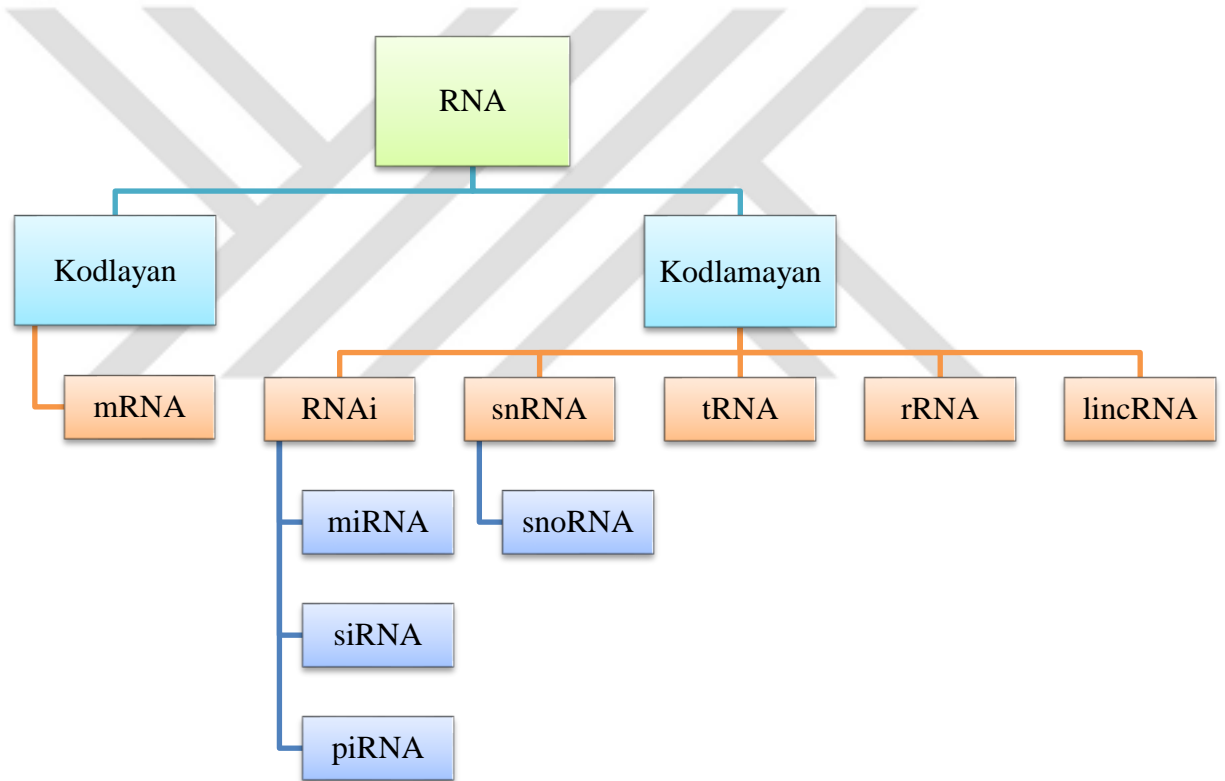
Geni RNA'ya kopyalama işlemi, RNA polimerazın izlediği dört evre ile gerçekleşmektedir. Bu evreler; kalıp DNA ipliğinin tanınması, başlatma, uzama ve sonlanma evreleridir.

İlk evrede; RNA polimeraz enziminin σ (sigma) alt ünitesinin DNA dizisi üzerinde bulunan RNA sentez komutunu veren promotöre bağlanması ile başlar. RNA polimeraz DNA'ya rastgele bağlanır ve destekleyici diziden önce -35 bölgesine geldiğinde gevşek bağlanır.

Başlama evresinde; RNA polimeraz -10 bölgesine ulaşır sıkı bağlanır ve burada iplik gevşemesiyle transkripsiyon kabarcığı oluşturur. 9 baz çifti sentezlendikten sonra başlama evresi biter RNA polimeraz promotörden ayrılır ve uzama evresi başlar.

Uzama evresinde; transkripsiyon 5' ucundan 3' ucuna doğru ilerler. Bu ilerleme ile sentezlenen RNA zinciri de uzar. Uzama evresinde sentezin ilerletilmesinin yanında, ikinci önemli adım da sentezlenen ürünün sağlamasının yapılmasıdır.

Kopyası çıkarılmış gen bölgeleri tamamlandıktan sonra, sentez işleminin durup RNA ürününün tahliye edilmesi gerekmektedir. Bu evre sonlanma evresini temsil eder. Sonlanma evresinde, RNA polimeraz nerede duracağını söyleyen belirli dizilerden zengin kalıplarla karşılaşır ve transkripsiyon sonlanıp, mesajcı RNA (mRNA) ürünü tahliye edilir.



Şekil 5. Kodlayan ve kodlamayan RNA moleküllerinin sınıflandırılması.

2.2.4. miRNA'ların Gen Anlatımı Üzerindeki Önemi

MikroRNA'lar (miRNA), 1993 yılında Ambros ve Ruvkin'in laboratuvarı tarafından, 22 nükleotid uzunluğunda, mRNA'nın 3'-kodlanmayan bölgesinden kısmi bütünleştiği küçük RNA'lar olarak sunulmuştur (Şekil 5) (20).

Gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rolü olan protein düzenleyicileri gibi, miRNA'lar da hücre gelişim, farklılaşma ve hastalık süreçlerinin kontrolünde önemli

rol oynamaktadır. Hatta bazı virüslerin enfeksiyon yeteneklerini geliştirmek için, buldukları konakların miRNA genlerini edindikleri ve manipüle ettikleri gösterilmiştir (21,22). miRNA düzeylerini değiştiren veya bloke eden yeni tedaviler protokolleri için yeni terapötiklerin arayışı devam etmektedir. ALL ile ilişkilendirilmiş miRNA'ların listesi Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. ALL'nin tanısı ve ayırıcı tanısında kullanılabilecek miRNA'lar (22).

miRNA	Gen lokusu	Hedefi
<i>miRNA-223</i>	Xq12	<i>FOXO</i> <i>LMO2</i>
<i>Let-7b</i>	22q13	<i>HMGA</i>
<i>miRNA-128a</i>	2q21	<i>BMI-1</i>
<i>miRNA-196a</i>	17q21-22	<i>HOXB8, ERG</i>
<i>miRNA-196b</i>	7p15, <i>HOXA9</i> ve <i>HOXA10</i> arasında	<i>C-myc</i>
<i>miRNA-125b-1</i>	11q24	<i>TRP3</i>
<i>miRNA-128-3p</i>		<i>PHF6</i>
<i>miRNA-148a</i>	7p15.2	<i>BIM, PTEN</i>
<i>miRNA-151</i>	Kromozom 8	<i>ITK, ZAP-70</i>
<i>miRNA-424</i>	Xq26.3	<i>NFI-A, VEGFR2</i> <i>HOXB4</i>
<i>miRNA-23a</i>	19p13.13	<i>BCR/ABL</i> <i>CXCL12</i>
<i>miRNA-27a</i>	19p13.13	<i>4-3-3θ</i>
<i>miRNA-221</i>	Xp11.3	<i>p27</i>

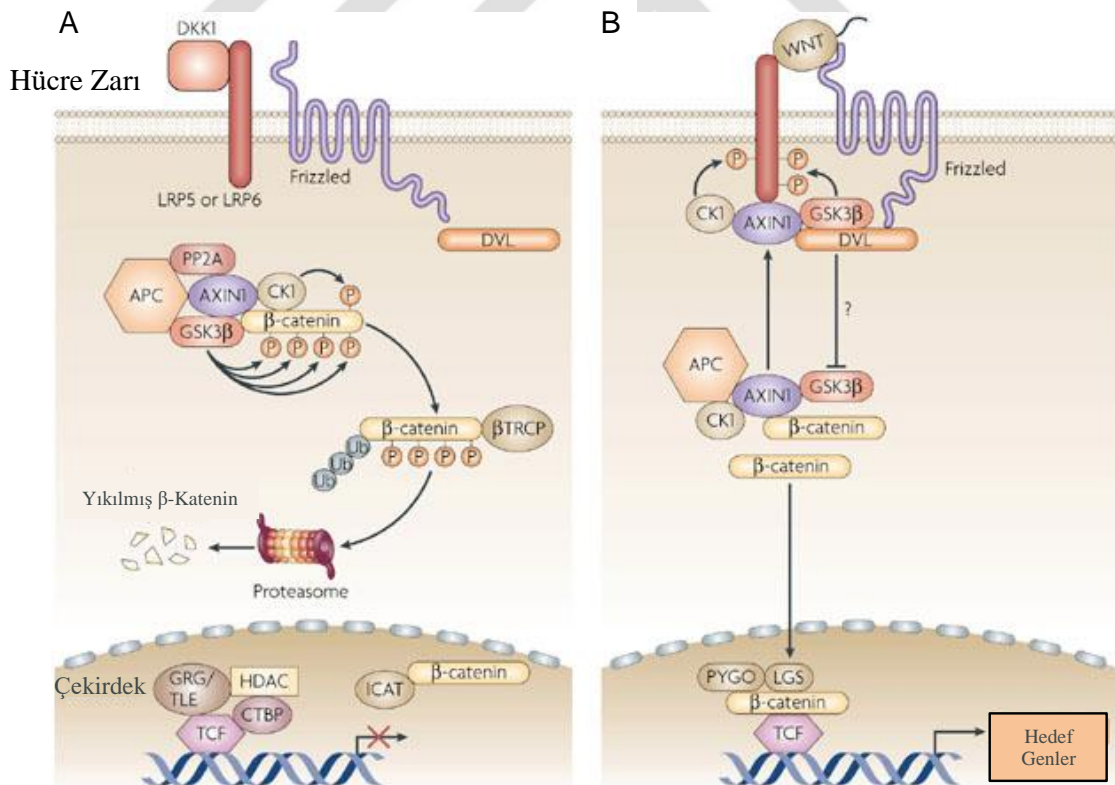
2.3. WNT Sinyal Yolağı

WNT yolağı, vücudun hemen hemen her organ sisteminin gelişiminde rol oynayan önemli bir gelişim yolağıdır (23). WNT sinyalizasyonunun birden fazla aktivasyon çeşidi tanımlanmıştır. Bunlardan ilki, kanonik veya WNT/ β -Katenin Yolağıdır. Diğerleri ise, kalsiyum sinyalleri veya JNK kinazlarının kullanıldığı ancak β -Katenin anlatım düzeyinin etkilenmediği kanonik olmayan yolaklardır .

2.3.1. Kanonik WNT Yolağı

β -Katenin'in kilit rol oynadığı WNT sinyal yolağıdır. WNT ligandının reseptör kompleksine bağlanmadığı durumda *APC*, *AXIN1*, *CSNK1A1(CK1)*, *GSK3 β* 'dan oluşan yıkım kompleksi, proteozomların da yardımıyla β -Katenin'i ubiquitinleyerek yıkıma uğratar.

WNT proteinleri, hücre zarında Frizzled proteinlerine ve *LRP5*, *LRP6* koreseptörlerine bağlanarak WNT sinyalizasyonunu başlatmış olur. Bu durumda *DVL* vasıtasıyla, Frizzled-LRP5/LRP6 kompleksi oluşur ve β -Katenin'in yıkım kompleksinde fosforillenmesinde göre alan *CSNK1A1* ve *GSK3 β* , *LRP5/LRP6*'yı fosforiller. Bu fosforillenme sonucunda *AXIN1* yıkım kompleksinden sitoplazmaya atılır. Bozulmuş olan yıkım kompleksinde *GSK3 β* WNT sinyalizasyonunu uyarır. Sitoplazmadaki *AXIN1* β -Katenin'in fosforillenerek yıkımını baskılar, sitoplazmada birikime uğrayan β -Katenin çekirdeğe geçer. Aktif β -Katenin-TCF transkripsiyon kompleksi oluşur ve WNT hedef genlerinin anlatımıyla sonuçlanır (Şekil 6).



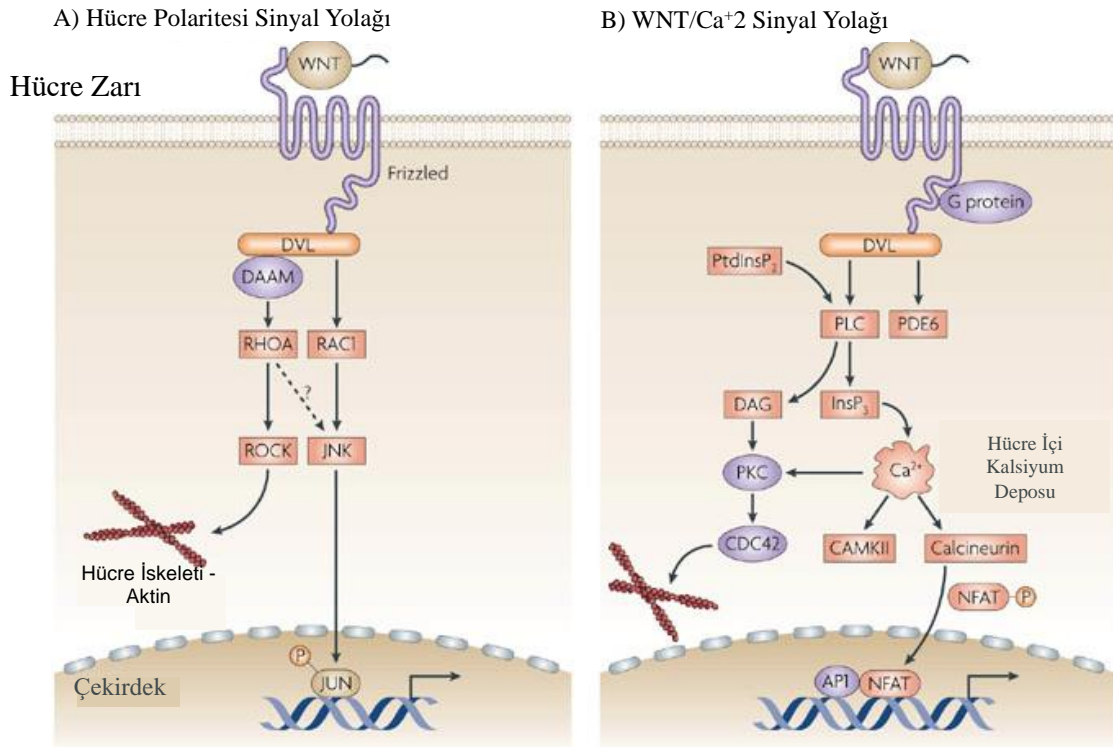
Şekil 6. A) Aktif olmayan ve B) olan Wnt sinyal yolları (24).

2.3.2. Kanonik Olmayan WNT Sinyal Yolakları

Hücre polaritesinin sağlanmasında rol alan sinyal yolu ve WNT/Ca²⁺ sinyal yolu kanonik olmayan yolaklardır. Bu yolaklar, β -Katenin anlatım düzeyinin etkilenmediği WNT yolaklarıdır. Bundan dolayı kanonik olmayan yolak olarak adlandırılırlar.

Hücre polaritesinin düzenlendiği yolak genellikle WNT5A ve WNT11 tarafından LRP'lerin dahil olmadığı Frizzled, DVL hatta G proteinler yoluyla sinyalizasyonu başlar. DVL, DAAM ile bağımlı olarak RHOA, hücre iskelet sisteminin yeniden düzenlenmesine aracılık eden ROCK yolağını aktive eder (25). Bunların yanında DVL, RAC1 ve JNK stres-yanıt yolağını aktive eder (Şekil 7). Bu yolak, hücre iskelerindeki değişimleri düzenleyerek, hücre adhezyonu ve migrasyonu için önemli olan sinyalleri düzene sokar. Bunun yanında β -Katenin protein düzeyini aşağı çekerek, lenfositlerdeki kanonik WNT sinyalizasyonunu baskılayabilir (26,27).

WNT5A ve Frizzled-2, bir diğer kanonik olmayan WNT yolağı olan WNT/Ca²⁺ sinyal yolunu başlatabilecek en büyük adaylardır (28,29). WNT-Frizzled kompleksi, G proteini vasıtasıyla PLC'yi ve bunu takiben PKC'yi aktive eder. Normalde sitoplazmada düşük seviyede tutulan Ca⁺ iyonları inositol trifofat (InsP₃) aracılığıyla artar. Artan Ca²⁺ ile PKC aktive olur kalsinörin artarak NFAT'ı aktive eder (Şekil) (30).



Şekil 7. Kanonik olmayan Wnt sinyal yolları. A) Hücre polaritesinin düzenlenmesinde rol oynayan, B) WNT/Ca²⁺ sinyal yolağı (24).

2.4 T-ALL'de WNT Sinyal Yolağının Durumu

Timustaki T lenfositlerin immatür fenotipiyle karakterize edilmiş olan T-ALL'de gelişim ile ilişkili yollardaki değişimler dikkat çekmektedir (31,32). Bazı çalışmalarda, önemli gelişim yollarından olan WNT yolağındaki devam eden aktivasyonların, oldukça agresif lösemilerin gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir (33,34).

Farelerle yapılan iki çalışma ile, tümör baskılayıcı özelliği olan *TCF1*'in T hücre gelişmesini engelleyerek T-ALL oluşumunda kilit rol oynadığı gösterilmiştir (35). Bu bulgunun yanında dikkat çeken başka bir nokta ise, timusta *TCF1*'in baskıladığı preoteinden olan *LEF1*'de tespit edilen yüksek anlatım değerleri olmuştur .

2.4. Yeni Nesil Dizileme

İnsan Genom Projesinin çıktularından olan Yeni Nesil Dizilemenin (YND), 1970'lerdeki iki boyutlu kromotografiye dayanan bir tarihi vardır. 1977'de Sanger zincir sonlandırma metodunun geliştirilmesiyle, bilime dünyası güvenilir ve aynı doğrulukla tekrarlanabilir dizileme yeteneğini kazanmış oldu. 1988'de kapiller elektroforez tabanlı "birinci nesil" dizileme ürünlerinin geliştirilmesiyle elde edilen dizileme ürünleri, her bir yürütme başına 84 kilobazdan (kb) 1 gigabaza (gb) ulaşmıştır (36). Kısa okuma ve paralel dizileme teknikleri, temelde farklı bir yaklaşım yaratmıştır. Genomik bilimi içerisinde devrim niteliğine sahip bu özelliklerinden dolayı "Yeni Nesil" olarak lanse edilmektedir.

Bu devrim gelişmeler eşliğinde 2005 yılında tek bir dizileme sonucunda 1 gb veri elde edilirken, 2014 yılında şaşırtıcı derecede bir yükselme ile tek bir dizileme verisi yaklaşık 1000 kat fazlaya; 1.8 terabaza ulaşmıştır. Bu ilerlemelerin sonucu olarak, binlerce insanın genom verisi incelenip arasındaki farklar tespit edilerek kanser, otizm, kalp hastalıkları veya şizofreni gibi hastalıklara neden olan kritik öneme sahip genlerin keşfinin mümkün olacağı düşünülmektedir (37).

YND sahası, araştırcılara genome, transkriptom veya epigenom hakkında sordukları sorulara çeşitli yöntemlerle cevap bulabilmelerine olanak sağlamaktadır. Bu geniş çeşitlilikteki methodlar, temel olarak başlangıç materyalinin DNA veya RNA olmasına göre farklılık göstermektedir. YND teknolojisini genomik, transkriptomik ve epigenomik olmak üzere 3 temel başlık altında inceleyebiliriz.

GENOMİK

Tüm genom dizileme; genomun tamamı olan 3.2 milyar bazı en geniş kapsamda sorgulayıp, en geniş kapsamda veri elde edilebilecek teknolojidir. Bu teknolojinin sağladığı yüksek veri çıktıısının getirisi olan dezavantaj da büyük veriyi doğru bir harita çizip yorumlamanın zorluğudur.

Ekzom dizileme; insan genomunun %2'sine karşılık gelen ekzom bölgesinin dizilenmesine olanak sağlamaktadır. Genomun küçük bir bölgesini temsil ediyor gibi gözükse de gen kodlayan bölge dizildiği için, hastalığa sebep olan varyantların büyük çoğunluğuna ulaşılabilecek bir veri elde edilir ve tüm genom dizilemeye kıyasla önemli bir alternatiftir. Ekzom dizileme teknolojisi insan popülasyon genetiği, genetik hastalıklar ve kanser çalışmaları gibi geniş uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Diğer dizileme teknolojilerine kıyasla, *de novo* dizilemedeki en büyük fark önceden herhangi bir referansı bulunmayan genomun, novel genom, dizilemesidir. Bu yöntem bir ön bilgi gerektirmez. Birleştirilmiş dizideki boşluk primer yürümesi ile boşluklar doldurulur ve bir referans yardımı olmadan veri elde edilmiş olur.

Amplikon (Hedefli) dizilemede; amaç, belli bir alt kümeyi temsil eden genlerin veya bölgelerin izole edilerek veri elde edilmesidir. Bu teknoloji araştırcılara, zaman kazancı, özel bir bölgenin verisinin detaylı incelenmesine yüksek çözünürlükte olanak sunmaktadır. Örnek vermek gerekirse, tüm genom dizileme ile bir bölge için elde edeceğimiz çözünürlük 30X ile 50X arası ikeni hedefli dizileme teknolojisi ile belirlediğimiz bölgenin çözünürlüğü 500X ile 1000x veya üzeri bir veri elde edebiliriz. Bu durum araştırcılara nadir varyanların veya büyük klonlar altında maskelenen küçük mutant klonlarının belirlenmesinde önemli bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır.

TRANSKRİPTOMİK

Transkriptom dizileme için birincil kütüphane hazırlama maddesi RNA'dır ve bu başlığın altındaki tüm teknolojiler aynı zamanda RNA-Dizileme olarak da adlandırılır. RNA Dizileme metodolojisinde RNA kütüphanesi hazırlandıktan sonra, ribozomlar uzaklaştırılıp, takiben cDNA sentezlenen bir örnek hazırlama protokolü ile başlamaktadır.

Transkriptom dizilemenin en büyük avantajı, aslında bir gen anlatım çalışması olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı, tüm transkriptom verisinin anlık bir görüntüsünü bize sunmaktadır. Tüm transkriptom verisi, hücrel transkripsiyonel profilinin kapsamlı olarak incelenmesini sağlamaktadır. Bu teknoloji, diğer YND teknolojilerinin bize sunmadığı alternatif kırılma bölgelerinin, novel transkriptlerin ve gen füzyonlarının tespitini sağlamaktadır.

Hedefli RNA dizileme teknolojisi; belli bir biyolojik özelliğin altında kümelenen yada bir yolağın üyesi olan genlere odaklanıp, transkriptom dizileme teknolojisinin avantajlarını yüksek çözünürlükte belirlenen alt kümeler çerçevesinde veri sunan bir teknolojidir.

Küçük RNA ve Kodlanmayan RNA dizileme; 18-22 baz çiftinden oluşan; gen anlatım sırasında düzenleyici, gen baskılayıcı yada gen susturucu olarak görev alan küçük RNAlar, kodlanmayan RNAlar ve mikroRNAlar bu gruba dahil olan biyolojik materyellerdir. Transkriptomik grubuna dahil bu teknoloji, bu gruba dahil RNAların transkripsiyonel ve translasyonel düzenleyici etkisini sunmaktadır.

EPİGENOMİK

DNA dizisi değişiminden ayrı olarak, kalıtlabilir değişiklik ve gen aktivite mekanizmalarını çalıştıran alana epigenomik denir. Bu değişiklikler içinde DNA metilasyonu, küçük RNA ilişkili düzenlemeler, DNA-protein etkileşimleri ve histon modifikasyonlarını ve daha fazlasını sayabiliriz. Epigenomik teknolojinin muhtemel

değişiklikler ve düzenleyici etkiler Metilasyon Dizileme, ChIP Dizileme ve Ribozom Profilleme tekniklerini yardımıyla incelenebilir.

Bu tez çalışmasının amacı;

- WNT yolağı aktive edilmiş T-ALL hücre hatlarında, WNT yolağı ilişkili genlerin anlatımlarının belirlenmesi,
- WNT yolağında kritik önemi olan genlerin alternatif kırılma ürünlerinin anlatım farklılıklarının belirlenmesi,
- Transkriptom datası aracılığıyla varyasyonların belirlenmesi,
- miRNA anlatım profilinin belirlenmesi,
- Tüm belirtilen amaçların hasta verisinde validasyonunun gerçekleştirilmesi,

Tüm bu maddelere ek olarak, bu tez kapsamında asıl amacımız, RNA-Dizileme için analiz algoritması oturtmak hedeflenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hatları

Çalışma lösemilerin tanıları için oluşturulmuş immünofenotiplendirme protokollerine göre gruplandırılmış ve ticari olarak üretilen ALL hücre hatlarından Jurkat ve Molt4 seçilmiştir. Seçilen bu hücre hatlarının temsil ettikleri dönemlere ait hücre yüzey belirteçleri Tablo 2’de gösterilmiştir.

Bu çalışma Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik AD araştırmaya laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Hücre hatlarında gerçekleştirildiği için etik kurul izni gerekmemektedir.

Tablo 2. Seçilen hücre hatların hücre yüzeylerinde ifade edilen belirteçler.

	Jurkat	Molt4
CD3	+	-
CD4	+	+
CD7	+	+
CD8	-	+
CD10	-	-
CD19	-	-
CD34	+	+
CD38	+	+
CD45RA	+	

3.1.2. Hasta Verileri

Tez çalışması kapsamında kullanılan kontrol örnekleri (T hücre gelişimine göre alt tiplere ayrılmış timus örnekleri n=6) ve hasta verileri (n=12) GEO veri tabanından alınan GEO49601 numaralı veri setinden alınmıştır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

Tez kapsamında kullanılan kimyasallar Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma
β -Merkaptoethanol	Sigma, Almanya
Etil Alkol	Merck, Almanya
Lityum Klorür	Sigma, Almanya
RPMI1640	Gibco,
FCS	Biochron,
Pen,	Biochron,

3.1.4. Kullanılan Kitler

Tez kapsamında kullanılan kitler Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan Kitler

Kit Adı	Firma
Spin Kolon RNA İzolasyon Kiti	Qiagen, Almanya
M-MLV	Roche, Almanya

3.1.5. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan Cihazlar.

Cihaz Adı	Firma
Hassas Terazı	Shimadzu
Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Çeker Ocak	Kermanlar
Otoklav	Kermanlar
Distile Su Cihazı	Millipore
Buzdolabı ve Deriin Dondurucu	Sanyo
Soğutmalı Santrifüj	Becman Coulter
Masaüstü Mini Santrifüj	Beckman Coulter
PZT Cihazı	BioRad
Gerçek zamanlı PZR Cihazı	Roche
Vorteks	Kermanlar
Laminer Hava Akımlı Kabin	Thermo Scientific
Spektrometre	Nanodrop
Bioanalizör	Agilent Technologies

3.1.6. Kullanılan Veri Tabanlarının Listesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan veri tabanlarının listesi Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan Veri Tabanlarının Listesi

Veri Tabanı	Açıklama
UCSC http://genome.ucsc.edu GRCh337/hg19	Referans sekans ve genomla ilgili bilgiler içeren, kullanıcıya çalışma alanı sağlayan bir veri tabanıdır.

NCBI (National Center for Biotechnology) Annotation Release 105 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	NCBI, referans sekans ve genom bilgilerini sağlayan bir veri tabanıdır.
DAVID (DAVID Bioinformatic Database) http://david.abcc.ncifcrf.gov	Fonksiyonel anotasyon analizlerinde kullanılan bir veri tabanıdır
GEO (Gene Expression Omnibus) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/	NCBI veri tabanının altında, ekspresyon ve varyasyon verilerinin depolandığı ve paylaşıldığı bir veri tabanıdır .
KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) http://www.kegg.jp/	KEGG, yolak analizlerinde kullanılan bir veri tabanıdır.
AmiGO2 http://amigo.geneontology.org/amigo/landing	AmiGo2, gen anotasyon analizlerinde kullanılan bir veri tabanıdır.

3.1.7. Kullanılan Analiz Programlarının Listesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan analiz programlarının listesi Tablo 7’de verilmiştir.

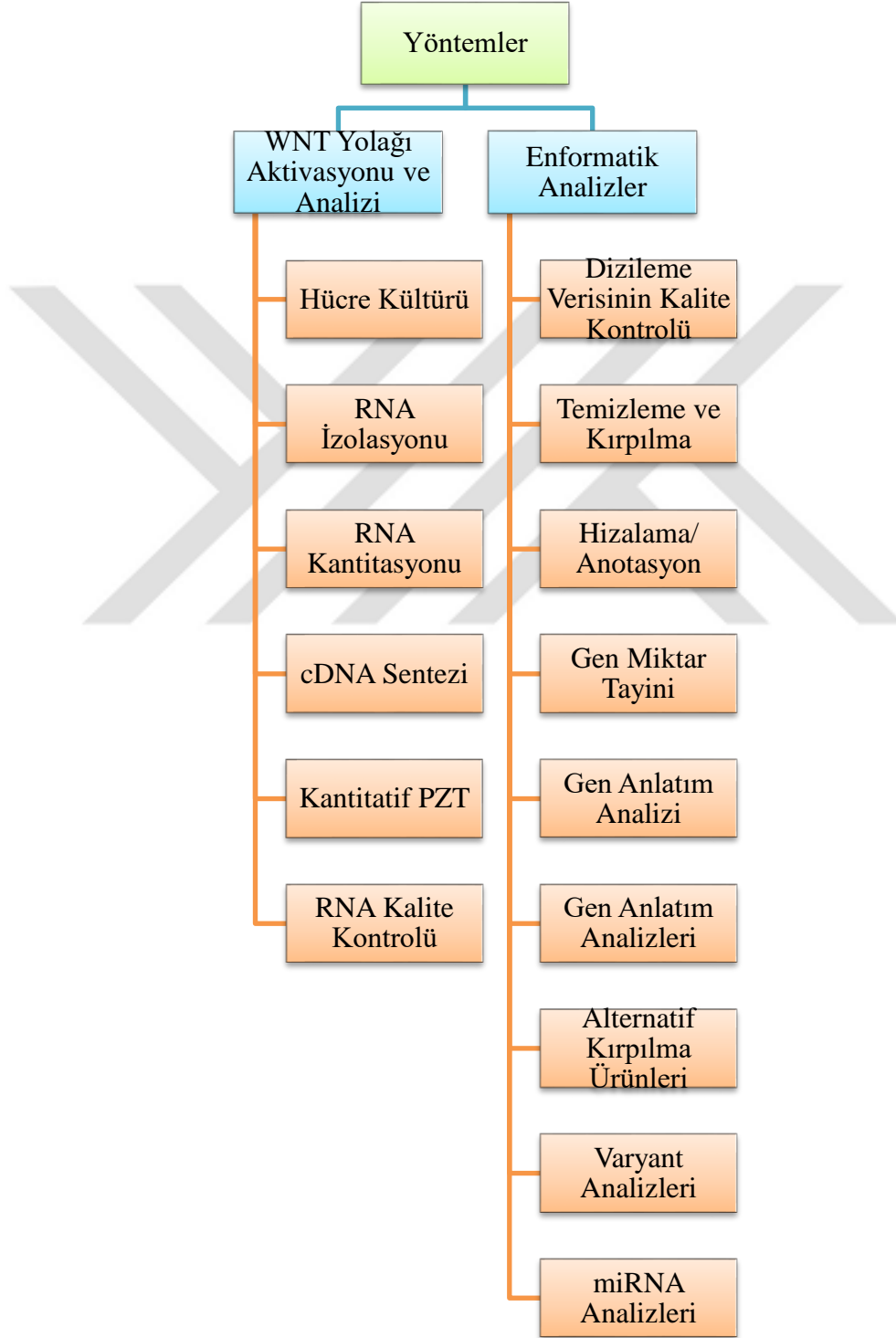
Tablo 7. Kullanılan Analiz Programlarının Listesi.

Program Adı	Açıklama
fastq-dump	SRA formatındaki RNA dizileme verisini FASTQ biçimine dönüştürüp analiz edilemeye uygun hale getirir.
fast-qc (Fast Quality Control)	FASTQ dosyalarının kalite kontrol değerlendirmelerini ve tekrarlanan adaptörlerini tespit eder.
Python	Python dilinde yazılan program ile tekrarlanan adaptörleri FASTQ formatında kaydeder.
Fast-mcf	Belli okuma değeri altında kalan bölgeleri kırpıp, adaptörleri kendi bölgeleri için “false-

	pozitifliği önlemek için veriden temizler.
RSEM Generator	Elde edilen referans genomu hizalama için hazırlayıp, “bowtie2” algoritmasına göre hizalamayı gerçekleştirmektedir.
The R Project for Statistical Computing	R grafik ve kapsamlı istatistiksel analizlerin yapılmasını sağlayan ücretsiz bir ara yüzdür.
Bioconductor	Yüksek çözünürlüklü verilerin analizinde R ara yüzünü kullanan bir biyoenformatik kaynaktır.
ESeq2	RNA dizileme gruplar arasında farklı anlatıma uğrayan genleri tespit eden veri analizidir.
DESeq2	RNA dizileme gruplar arasında farklı anlatıma uğrayan genleri tespit eden veri analizidir.
ClustVis	İnteraktif ısı haritaları ile genom verilerinin görselleştirilmesinde ve analizinde kullanılan bir uygulama birimidir.

3.2. Yöntemler

Tez kapsamında uygulanan yöntemler Şekil 8'deki iş akış şemasında özetlenmiştir.



Şekil 8: Uygulanan yöntemlerin iş akış şeması.

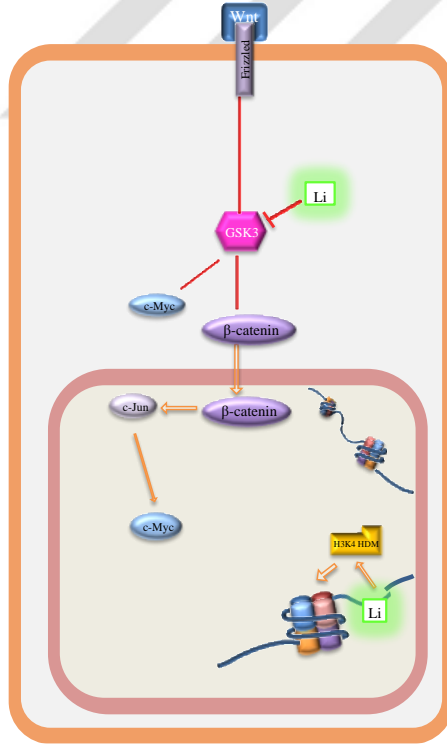
3.2.1. Hücre Kültürü

Seçmiş olduğumuz Jurkat ve Molt4, T-ALL hastalığının farklı evrelerini temsil eden, hücre serileri %10 FCS, 2mM L-glutamin, streptomisin (100mg/mL) ve penisilin (100U/mL) içeren RPMI 1649 besi yerinde ve %5 CO₂ içeren ortamda 37°C de inkübasyona bırakıldı. Üçüncü pasaja LiCl muamelesi ile devam edildi.

3.2.2. Hücre Serilerinde β -Kateninin Uyarılması

Kültür edilen hücre hatlarından, 4 milyon hücre 12 ml besiyeri içerisine alındı ve 240 μ l 1M LiCl eklenerek bir gece inkübe edildi (Şekil 9).

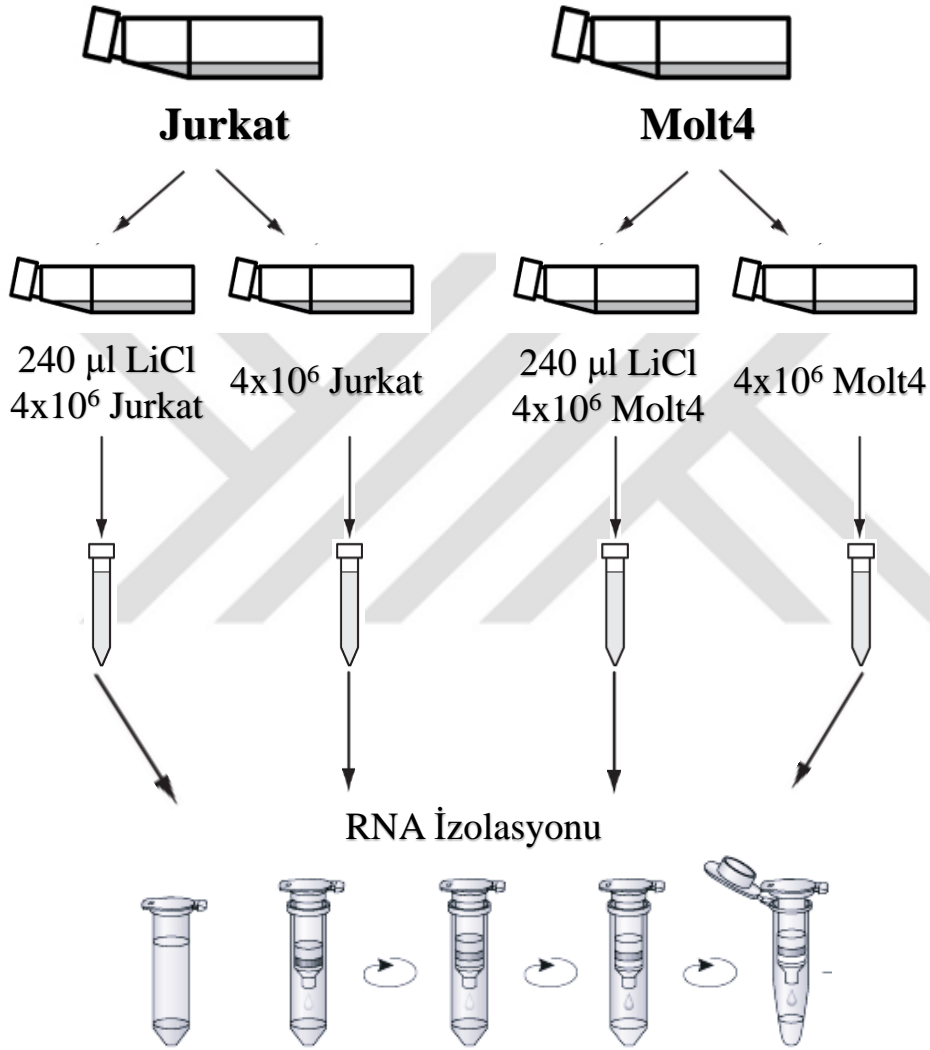
Her hücre hattı, muamele edilmiş ve edilmemiş olarak ayrıldı ve her bir grup biyolojik tekrar olacak şekilde duplike çalışıldı.



Şekil 9. LiCl etkilediği yollar.

3.2.3. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

Hücre kültüründen toplanan örnekler, 600 μ l Solüsyon D içinde homojenize edildi ve kit protokolüne uygun bir şekilde RNA izole edildi (Şekil 10) (Qiagen, Almanya). Nanodrop 1100 cihazı ile RNA miktar tayini yapıldı. Elde ettiğimiz RNA örnekleri uygun şekilde etiketlenerek -80°C 'de saklandı.



Şekil 10: Hücre hatlarının LiCl ile muamelesi ve muamele sonunda toplanan hücrelerden RNA eldesi.

3.2.4. cDNA Sentezi

Spektrofotometre kullanılarak RNA örneklerinin kalite ve miktar tayinleri yapıldı. Herbir RNA örneği 10 μ l de 1 μ g olacak şekilde sulandırıldı ve 65°C 'de 10

5 dakika inkübe edilip hemen buz üzerine alındı. Buz üzerindeyken Tablo 8’de belirtilen koşullarda hazırlanan reaksiyon karışımı eklendi.

Tablo 8. cDNA sentezinde kullanılan reaksiyon karışımının koşulları

Reaksiyon Karışımı

5X M-MLV Tampon

0.1 mM DTT 0.1 M

25mM DNTP Karışımı 10 mM

5mg/ml Random Primer 25 mM

M-MLV enzim 200U

Rnase İnhibitör 40U/ μ l

dH₂O

Bu karışım, eklendikten sonra ilk olarak 37°C’de 2 saat ardından 65°C’de 5 dakika inkübe edildi. Elde ettiğimiz cDNA örnekleri -20°C’de uygun şekilde etiketlenerek saklandı.

3.2.5. Kantitatif PZT

Uygulamış olduğumuz LiCl muamelesi sonucu WNT yolağı aktivasyonunu takip etmek için bu yolakta görev yapan genlerden *AXIN*, *B-KATENİN* ve *LEF1* anlatım düzeyleri belirlendi. Normalizasyon için her hücrede eşit anlatım gösterdiği kabul edilen gardiyan genlerden siklofilin kullanılmıştır. LC480 (Roche, İsviçre) cihazında Universal Probe Library (UPL) prob kullanarak gen anlatım düzeylerini kontrol ettik.

Hücre kültüründen topladığımız örneklerden elde ettiğimiz cDNA’lar kullanılarak belirlenen genler için kantitatif primer zincir tepkimesi (kPZT) uygulandı (Tablo 9). kPZT ile elde edilen relatif gen anlatım düzeyleri, Δ CT yöntemiyle

hesaplanmıştır (38). PZT protokolüne ait sıcaklık ve döngüler Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 9: Kantitatif PZT reaksiyon karışımı içeriği

Reaksiyon Karışımı	Konsantrasyon (μ l)	Nihai Miktar
Master Karışım	2X	5 μ l
Forward Primer	10 pmol	0.5 μ l
Reverse Primer	10 pmol	0.5 μ l
Prob	10 μ M	0.2 μ l
dH ₂ O	-	1.8 μ l
cDNA	-	2 μ l

Tablo 10: Kantitatif PZT protokolü.

PZT Aşaması	Sıcaklık ve Süre	Döngü
Ön- inkübasyon	95°C 10'	
	95°C 10''	
Amplifikasyon	60°C 30''	45 döngü
	72°C 1''	
Soğuma	40°C 30''	

3.2.6. RNA Kalite Kontrolü

Muamelenin uygun olduğuna karar verildikten sonra, RNA materyellerinin bozulma miktarına dayalı prensip ile 28S/18S oranını ölçmek için RNA örneklerinin kalite kontrollerini çipli sistem olan Bioanalyzer (Agilent, ABD) ile gerçekleştirildi.

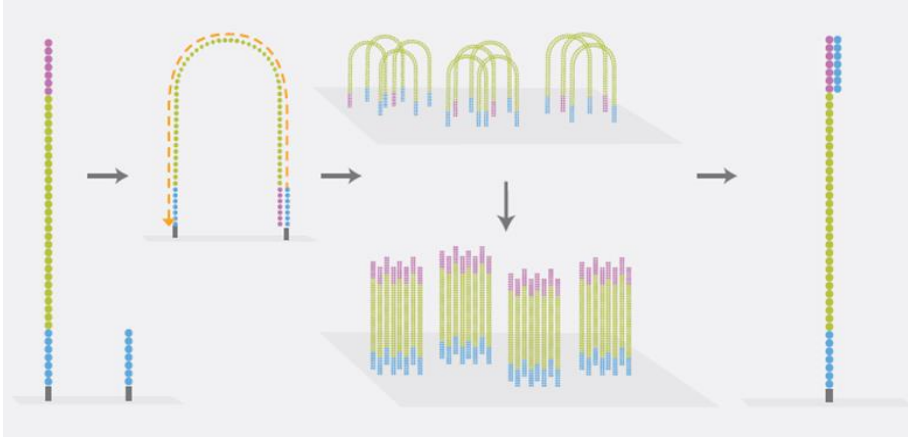
3.2.7. Yeni Nesil RNA Dizileme

Belirlediğimiz örnek grupları arasındaki transkriptom düzeyindeki farklılıklarını görebilmek için gerçekleştirdiğimiz RNA dizileme, Genewiz firması aracılığı ile hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir. Örneklerimiz, İllumina HiSeq 2500 teknolojisi ile dizilenmiştir. İllumina cihazının dizileme teknolojisi sentezleyerek dizileme (Sequence by Synthesis (SBS)) teknolojisine dayanmaktadır.

Dizileme temel olarak iki aşamada gerçekleşmektedir; kümeler oluşturma ve dizileme.

Kümeleme; her bir fragmanın izotermik olarak çoğaltılmasıyla oluşturulmaktadır. Kümeler cam yüzeyden oluşan akış kuvvetlerinin içinde gerçekleşmektedir. Cam yüzeylerin üzerinde ileri ve ters iplikleri tanıyan iki çeşit oligo bulunmaktadır. Bu oligolar; bir iplik üzerindeki adaptör bölgelerinden birini tanımaktadır ve dizilerin hibridizasyonunu sağlamaktadır.

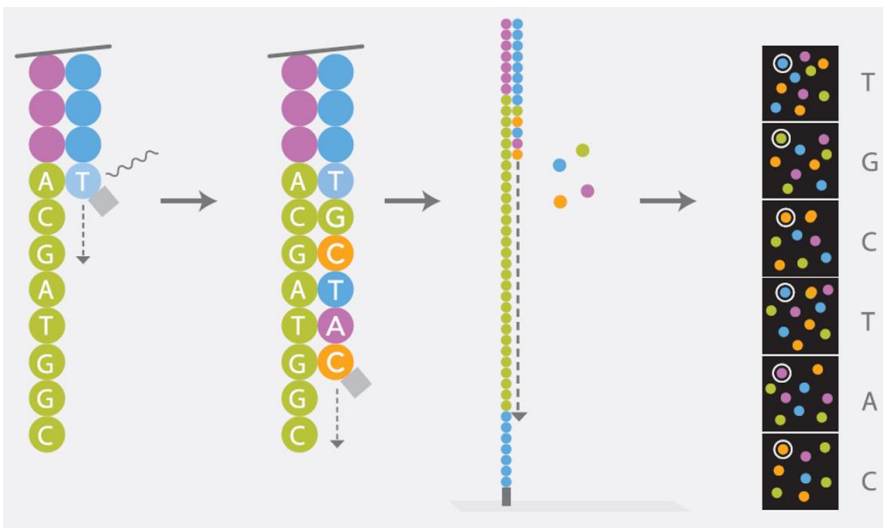
Hibridize olan iplik; adaptör bölgesindeki diğer oligoyu tanıyarak köprü kurar ve komplementerini hibridize eder ve böylece ileri ve ters iplikler sentezlenmiş olur. Bu işlem tekrarlanarak milyonlarca küme oluşturulur (Şekil 11).



Şekil 11: RNA-Dizileme kümeleme (36).

Dizileme aşamasında; örnekler dizilemeye hazırlanırken ipliklerin tanınması için takılan dizileme primerlerini tanımaktadır ve dizileme bu primerler ile başlamaktadır. Fakat okumalar dizileme primerlerinden sonraki ilk baz ile başlamaktadır. Her baza özgü floresan ışınmasıyla okuma gerçekleştirilmektedir. Bu okuma sistemine sentezleyerek dizileme teknolojisi denmektedir. Bu sistemle her eş iplikler eş zamanlı okunmaktadır. Oluşturulan yüzeylerde kümeler kitlesel paralel dizileme teknolojisiyle okunmaktadır.

Okuma işlemleri ileri iplikler için gerçekleştirilir ve tek ipliği okuma sistemine denir (Şekil 12).



Şekil 12: RNA-Dizileme SBS dizileme (36).

3.2.8. Biyoenformatik Analizler

RNA dizileme sonucu elde edilen verinin kabul görmüş bir altın standardı bulunmamaktadır. Bu nedenle tez kapsamında kullanılan örnekler için farklı algoritma kombinasyonları test edilip en uygun algoritma seçilmiştir.

Dizileme verisi, hizmet alınan firmadan dosya aktarım iletişim kuralı (FTP) aracılığıyla çevrimiçi yöntemlerle ulaşıldı.

Elde edilen yüksek çıktılı transkriptom verileri, yaptığımız ön çalışmalar ile belirlediğimiz veri analiz algoritması yardımıyla analiz edilmiştir.

3.2.8.1. Kalite Kontrol ve Temizleme

3.2.8.2. Dizileme Verilerinin Kalite Kontrolü

RNA dizileme verisinin kalite kontrol değerlendirmeleri ve tekrarlanan adaptörlerin tespiti, “Fasta Quality Control” (FastQC) (Babraham Bioinformatics) tespit aracı ile sağlanmaktadır. FastQC aracının “fastq-mcf” alt aracı ile, dizileme sonucunda elimizdeki FastQ formatındaki ham veri, ön işleme raporlaması ile kalite değerlendirmesi yapıp okuma kalite değerleri için belirlenen eşik değere göre değerlendirilir (28 baz çifti < okuma değerleri kabul edilir). Bu eşik değer taban alınarak düşük kalitedeki okumalar temizlenip kırılmış, örneklerin dizileme esnasında karışmalarını için eklenen işaret olan adaptörlerden de kalanlar temizlenmiştir.

3.2.8.3. Referans Genoma Hizalanması ve Gen Anlatımlarının Profillendirilmesi

Kalite kontrol ve temizleme sonrasında değerlendirmeye uygun hale getirdiğimiz veriler, literatürde en çok kullanılan BOWTIE2 ve STAR hizalama araçları ile hg19 referans genoma hizalanmıştır. Hizalama sırasında genlerin uzunlukları ve ilgili gen bölgesi için okuma derinliği değerlendirilerek “Fragment Per Kilobase Per Million” şeklinde ifade edilen gen anlatım değerleri normalizasyonu tamamlanmış şekilde hesaplanmıştır (Şekil 13).

$$FPKM = \frac{ER \times 10^9}{EL \times MR \times 2}$$

ER) Gen bölgesi için okuma derinliği, *EL*) İlgili gen bölgesinin uzunluğu, *MR*) Deneydeki toplam derinlik değeri.

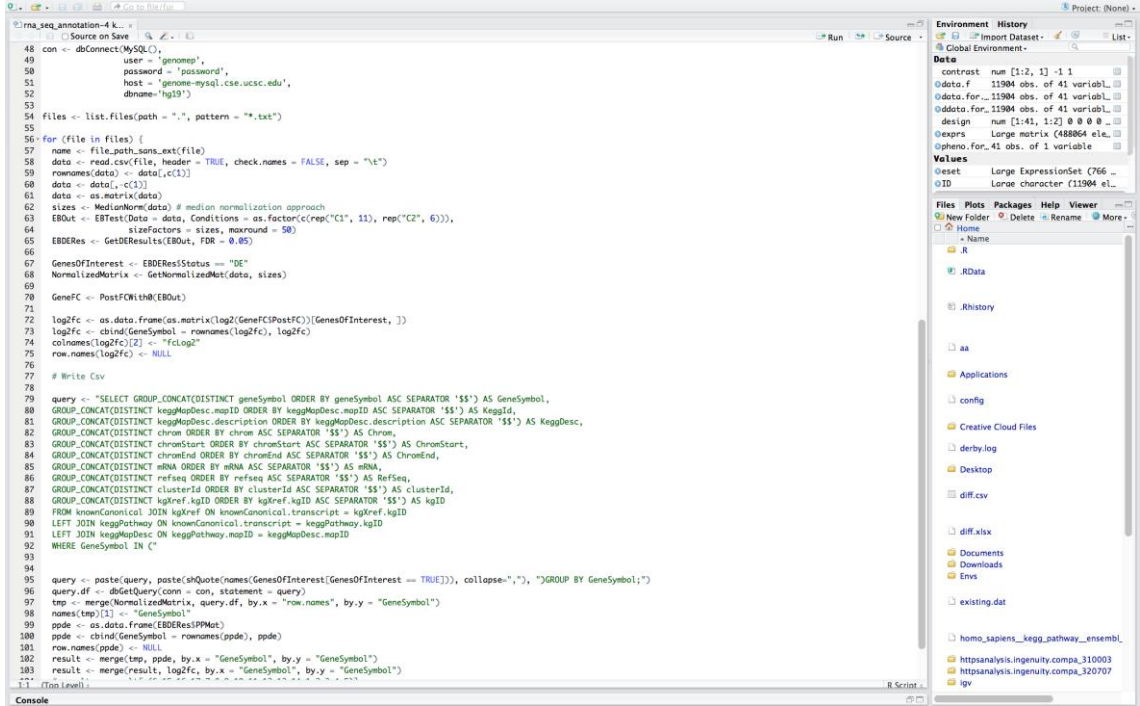
ÖNCESİ	Gen Adı	1. Tekrar Okuma Sayısı	2. Tekrar Okuma Sayısı	3. Tekrar Okuma Sayısı
	A Geni (2 kb)	10	12	30
	B Geni (4 kb)	20	25	60
	C Geni (1 kb)	5	8	15
	D Geni (10 kb)	0	0	1
SONRASI	Gen Adı	1. Tekrar FPKM Değeri	2. Tekrar FPKM Değeri	3. Tekrar FPKM Değeri
	A Geni (2 kb)	1.43	1.33	1.42
	B Geni (4 kb)	1.43	1.39	1.32
	C Geni (1 kb)	1.43	1.78	1.42
	D Geni (10 kb)	0	0	0.009

Şekil 13. İlgili gen için okuma derinliği ve gen uzunluğuna göre normalize edilmemiş (öncesi) ve edilmiş (sonrası) değerlerin temsili olarak gösterimi. Farklı sayıdaki okuma değerine sahip olan farklı uzunluktaki genlerin aslında aynı gen anlatım profilini gösterebileceğini göstermek için değerler temsili olarak gösterilmiştir.

3.2.8.4. Gen Anlatım Analizi

Elde ettiğimiz FPKM değerlerini kullanarak tüm veri içerisindeki anlamlı olarak anlatımı değişen genleri tespit etmek için EBSeq paketi ve Cufflinks aracı kullanılmıştır.

EBSeq, R programlama içerisindeki biyolojik analizler yapılabilecek platform olan Bioconductor bünyesinde bir pakettir ve gen anlatım profilleri hesaplamalarında kullanılmaktadır. R programlamada, yazdığımız algoritmaları çalıştırıp hesaplamaları gerçekleştirdiğimiz R Studio'nun kullanıcı ara yüzü Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14. R Studio'nun kullanıcı ara yüzü.

Cufflinks (Cole Trapnell's Lab) ise, RNA-dizileme için diferansiyel gen anlatımı hesaplama üzere ortak üç matematik ve hesaplamalı Biyoloji laboratuvarlarının geliştirdiği bir araçtır (<http://cole-trapnell-lab.github.io/cufflinks/>).

3.2.8.5. Tüm Transkriptom Analiz

Gen anlatım hesaplamaları sonucunda anlamlı değişiklik gösteren ($p < 0.05$) genlerin logaritmik kat değişimleri tespit edilmiş ve bu genler ve değişim kat sayıları ClusVis (Ref) programı aracılığıyla R dilinde yazılmış program ile ısı haritasına yerleştirilmiştir.

Tespit ettiğimiz genler, “The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (DAVID) veri tabanı kullanılarak yolak ve zenginleştirme analizleri yapılmıştır (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

3.2.8.6. Gen Anlatım Analizi

Hizalanmış veri içerisinde, WNT yolağı ilişkili genlerin FPKM değerleri çekilip EBSeq ve Cufflinks ile bu genlerin anlatım profilleri hesaplanmış, anlamlı olan genlerin ($p < 0.05$) logaritmik kat değişimleri tespit edilmiş ve bu genler ısı haritasında görselleştirilmiştir.

3.2.8.7. Alternatif Kırılma Ürünleri

mRNA oluşurken ortaya çıkan gen ürünleri, alternatif noktalardan kırılma sonucunda farklı ürünler oluşabilir. Bu oluşan alternatif ürünlerin anlatım miktarlarını ifade eden FPKM değerleri, GraphPad programına yerleştirilip LiCl ile uyarılmış hücre hatlarında, kontrol örneklerinde ve hastalardaki durumlarını gösteren scatter plot grafiği çizilmiştir.

3.2.8.8. Varyant Analizleri

Hizaladığımız verinin çıktılardan biri de “Variant Calling File” (.vcf) olan verideki varyasyonlar ile ilgili bilgi içeren bir dosyadır. Hizalama sonucunda elde ettiğimiz .vcf uzantılı dosya, Illumina firmasının varyant analizleri için geliştirdiği ticari yazılım olan VariantStudio’da analiz edilmiştir.

3.2.8.9. miRNA Analizleri

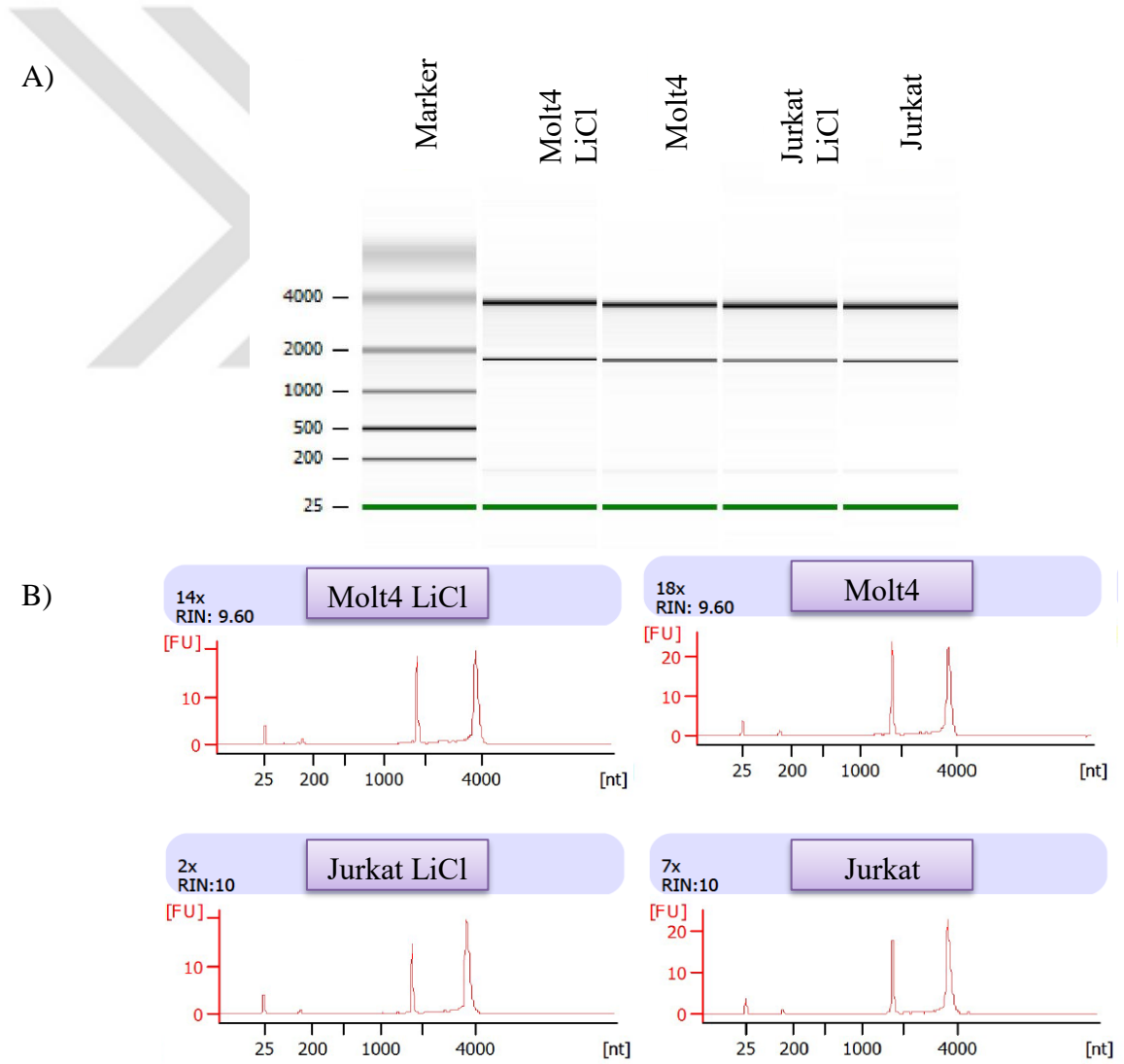
miRNA analizleri, R-Bioconductor paketlerinden diferansiyel anlatımların hesaplanmasında kullanılan DeSeq paketi ile anlamlı olarak anlatımı değişmiş miRNA’lar hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. WNT yolağının aktivasyonu ve validasyonu

4.1.1. RNA Kalite Kontrolü

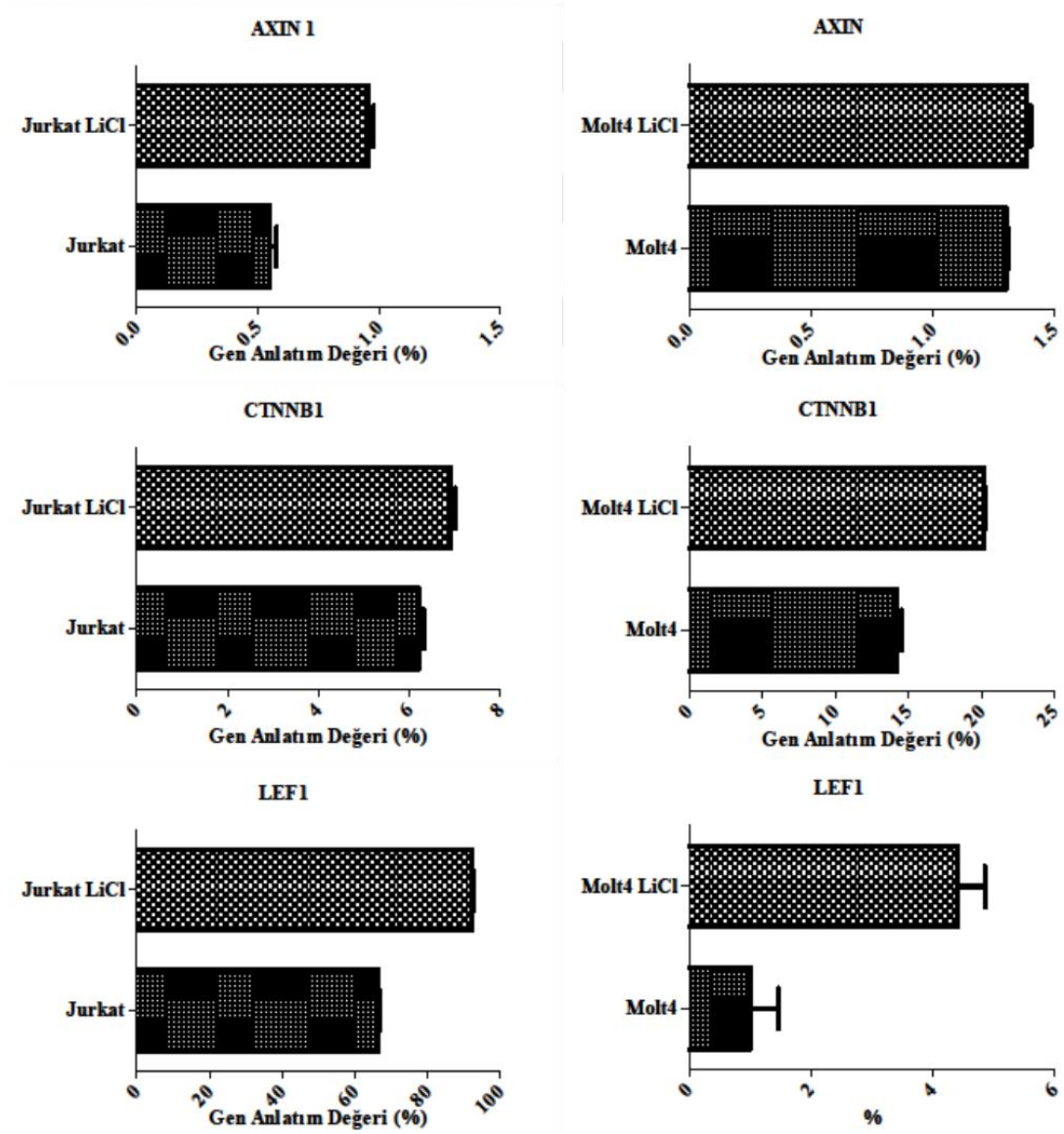
Yeni nesil transkriptom dizilemeden verimli sonuç alabilmek için RNA'nın 28S/18S oranını temsil eden RIN sayısının 7'den büyük olması gerekmektedir. Jurkat için RIN sayısı 10, Jurkat LiCl için 10, Molt4 için 9.6 ve Molt4 LiCl için de 9.6 olarak ölçülmüştür. Örneklerin çipli sistemdeki yürütme sonuçları Şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 15: RNA örneklerinin Biyoanalizör cihazındaki ölçüm sonuçları. A) çipli sisteme yüklenmiş örneklerin jel görüntüsü. B) 28S/18S oranının hesaplanabilmesi için gerekli okuma değerlerinin grafikleri.

4.1.2. Kantitatif PZT

Hücre kültüründe LiCl ile yapılan aktivasyonu muamelesinin kontrolünün amacıyla amacıyla, WNT yolağındaki kilit genlerden *AXIN2*, *CTNNB1* ve *LEF1* genlerinin anlatımı belirlendi.. LiCl ile muamele edilmiş hücre hatlarında edilmemişlere göre daha yüksek anlatım gözlenmiş ve yapılan muamelenin gerçekleştiğine karar verilmiştir (Şekil 16). Gen anlatımlarındaki relatif artış miktarları Şekil 16'de, p değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir.



Şekil 16. LiCl muamelesinin sonrasında *AXIN2*, *CTNNB1* ve *LEF1* genlerinin anlatımlarını gösteren kantitatif PZR sonuçları.

Tablo 11. Gen anlatımındaki değişimlerin üçlü olarak çalışılan sayımsal PZT sonuçlarının P-değerleri.

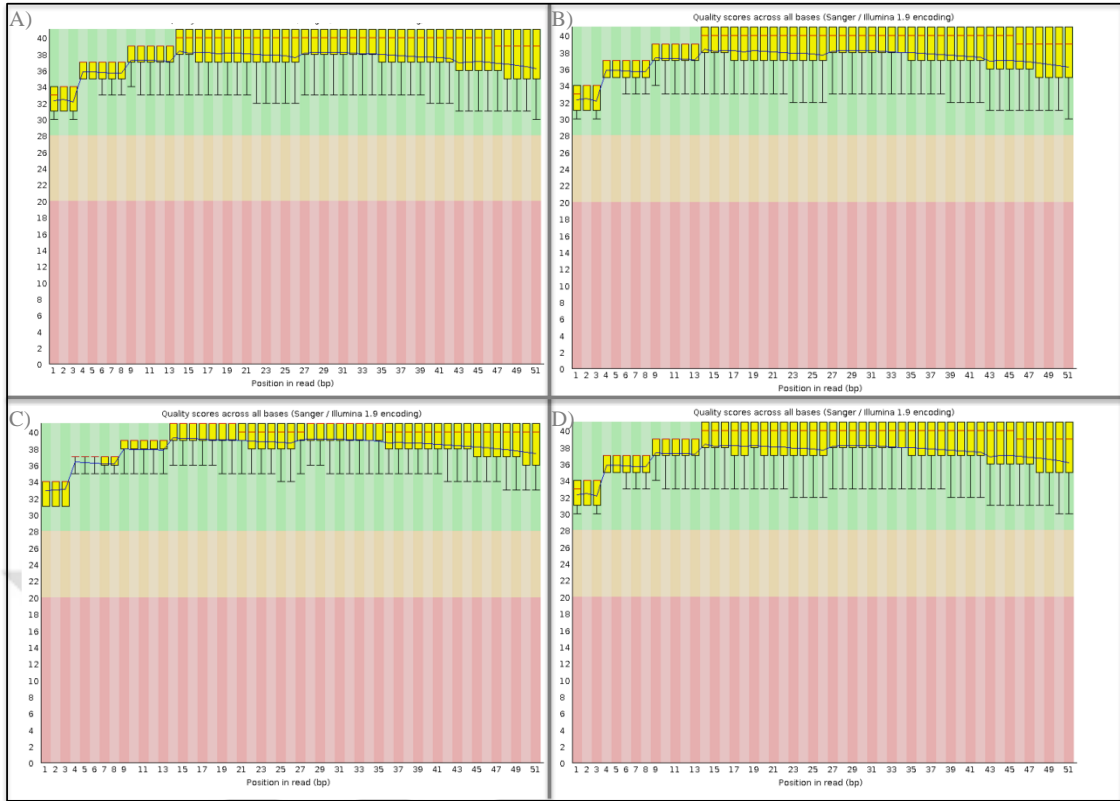
Hücre Hattı	Gen	P Değeri
Jurkat	<i>AXIN2</i>	0,0021
	<i>CTNNB1</i>	0,0561
	<i>LEF1</i>	0,0128
Molt4	<i>AXIN2</i>	0,0004
	<i>CTNNB1</i>	0,0008
	<i>LEF1</i>	0,0226

4.2. Enformatik Bulgular

4.2.1. Ön İşleme

4.2.1.1. Kalite Kontrol ve Temizleme

Dizileme sonucunda elde ettiğimiz .fastq dosyalarımız, FastQC (Babraham Bioinformatics) kullanılarak dizilenen örneklerimizin kalite değerleri ve dizi içinde kalmış adaptörler belirlendi. Örnekler içinde tespit edilen adaptörler kırıldı. Şekil 17 'de örneklerin kalite kontrol grafikleri verilmiştir.



Şekil 17: Dizilenmiş RNA örneklerinin okumaları için gerçekleştirilmiş kalite kontrol analizi sonucu. Sarı barlarda gösterilen her bir fragmanın okuma kaliteleri buldukları alanlarda belirtilmiştir. Yeşil alan; kaliteli okuma, sarı ve kırmızı alanlar ise dizilerde kalan adaptörler veya kısa okumalar olduğunu işaret etmektedir.

4.2.2. Referans Genoma Hizalanması ve Gen Anlatımlarının Profillendirilmesi

Örnekler literatürde en çok tercih edilen Bowtie2 ve STAR hizalama araçları kullanılarak hg19 referans genomuna hizalandı. Hizalanan veride gen okuma değerlerini merci olarak her genin mutlak anlatım değerini ifade eden FPKM değerleri hesaplandı.

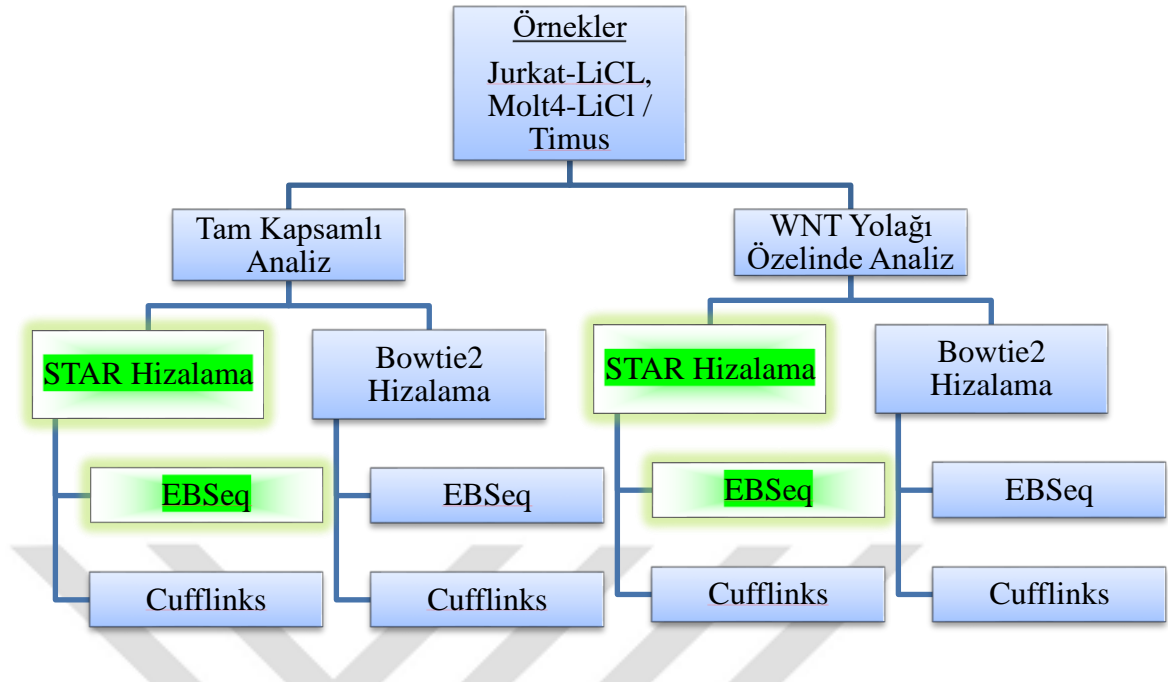
4.2.3. Gen Anlatım Analizi

Örnek havuzundan belirlenen grupların herbiri EBSeq ve Cufflinks analiz araçları ile farklı anlatım profili gösteren genler tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 18). Bu sonuçları dikkate aldığımızda, tam kapsamlı analizde Bowtie hizalama sonucunda elde edilen verilerde EBSeq kullanılarak gen anlatımlarını hesaplandığında 1784, Cufflinks

kullanıldığında ise 116 diferansiyel anlatım farklılığı gösteren gen tespit edildi. STAR hizalama aracından elde edilen veri sonucunda ise Bowtie ile 1638 ve Cufflinks ile 1677 adet anlatım farklılığı gösteren gen tespit edildi. Aynı hesaplamalar WNT yolağındaki genler seçilerek tekrarlandı. Bowtie kullanıldığında EBSeq ile 20 Cufflinks ile iki adet anlatım farklılığı gösteren gen tespit edildi. STAR kullanıldığında ise EBSeq ile 24, Cufflinks ile 64 anlatım farklılığı gösteren gen tespit edildi. Bu sonuçlar dikkate alındığında da, proje kapsamında STAR hizalama aracı ile EBSeq hesaplama aracını kullanarak devam etmeye karar verildi (Şekil 19).

Tam Kapsamlı Analiz			
Farklı Anlatımları Hesaplama			
Hizalama Araçları	LiCl ile Uyarılmış Hücre Hatları vs Timus Havuzu	EBSeq	Cufflinks
	Bowtie	1784	116
	STAR	1638	1677
WNT Yolağı			
Farklı Anlatımları Hesaplama			
Hizalama Araçları	LiCl ile Uyarılmış Hücre Hatları vs Timus Havuzu	EBSeq	Cufflinks
	Bowtie	20	2
	STAR	24	64

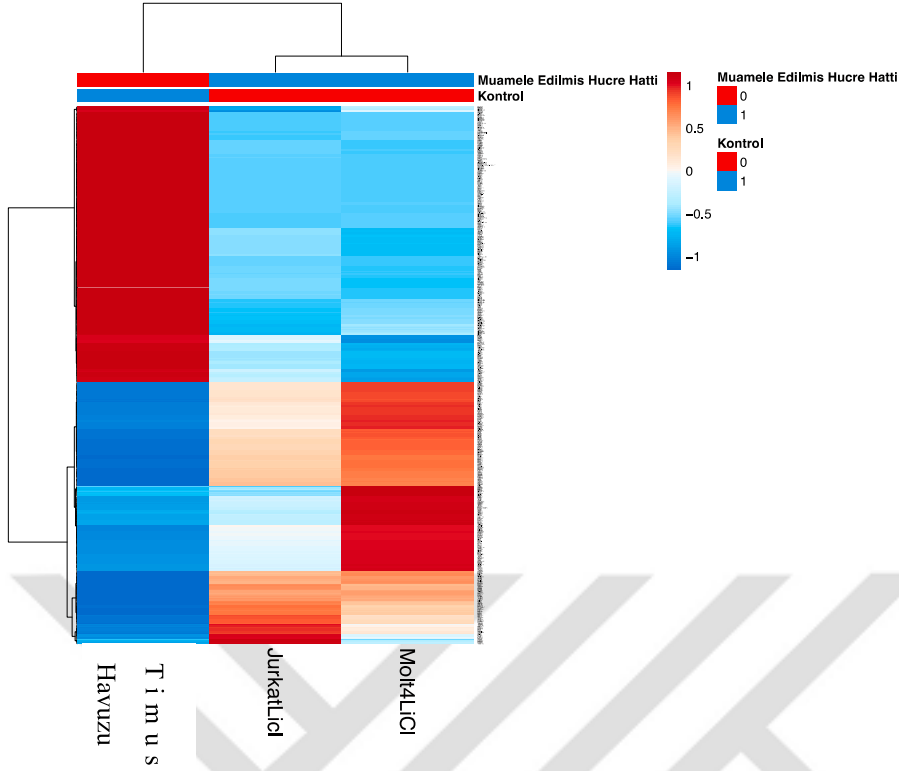
Şekil 18: Farklı araçlarla hizalanmış ve gen anlatım profilleri hesaplanmış örneklere genel bakış.



Şekil 19: Gen anlatım analizleri akış şeması. Yeşil ile gösterilen hizalama araçları ve hesaplama metodları ile devam edilmiştir.

4.2.4. Tüm Transkriptom Analiz

Isı haritası için oluşturduğumuz algorithmada en çok 1200 gen ile çalışılması mümkündür. Seçilen araçlardan elde edilen sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, logaritmik değer ve p değerleri açısından değerlendirildiğinde en anlamlı sonuç veren 1200 gene ait gen anlatım profilleri, ısı haritalarına yerleştirilip gen anlatım düzeyleri görselleştirilmiştir (Şekil 20). LiCl muamelesi görmüş hücre hatlarının, kontrol örneği olan timus havuzundan farklı bir anlatım profili gösterdiği, ısı haritasında herhangi bir etiketleme yapılmadan kümelenmesi ile gösterilmiştir.



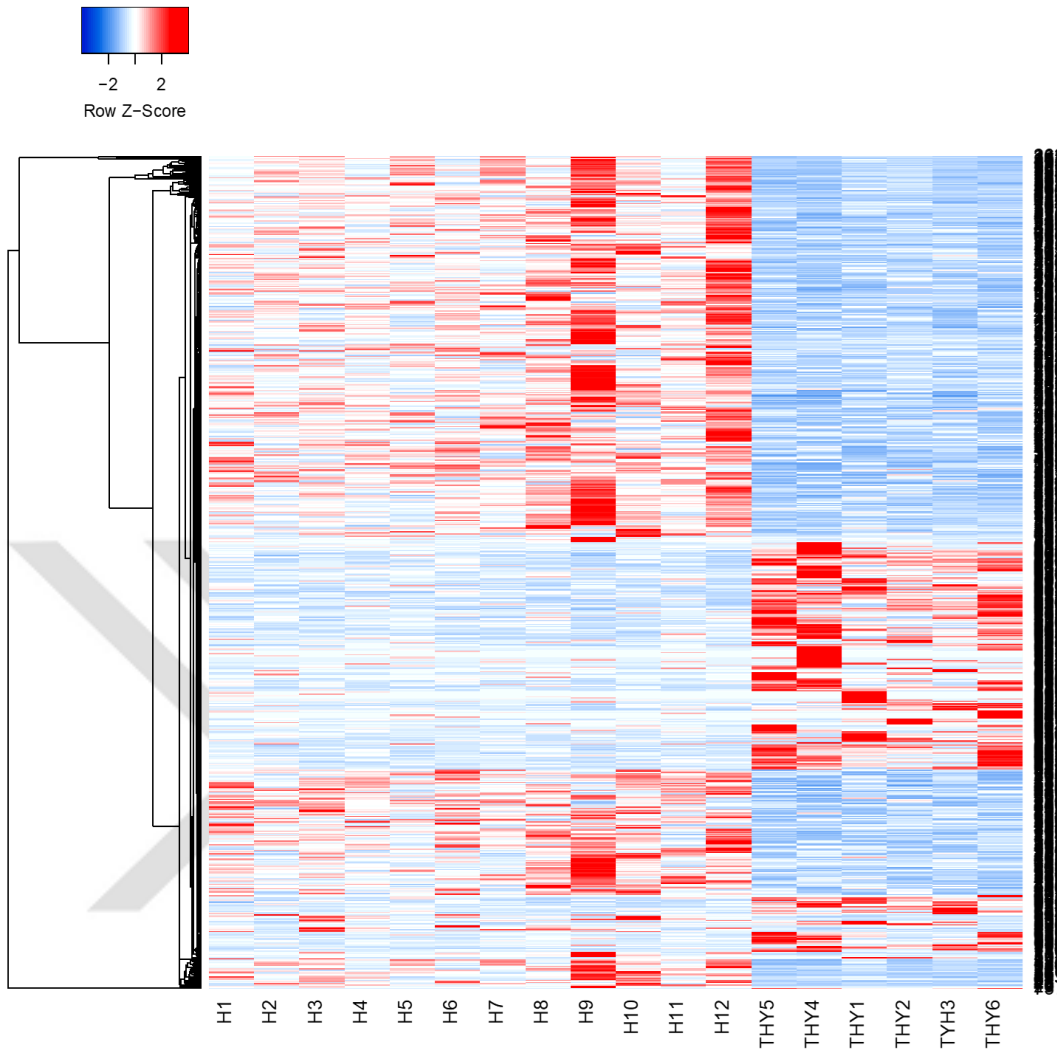
Şekil 20: Tüm transkriptom analizinde, gen anlatım ısı grafiği.

Tablo 12: Uyarılmış hücre hatları ve hasta grubunda ortak anlatımı değişen WNT genlerinin dahil oldukları diğer yollar.

Yolak Adı	P Değeri	Genler
Ribozom	3,96E+07	<i>RPSA, RPL19, RPL14, RPL13, RPL27A, RPL26, RPL35, RPL37, RPL38, RPS2, RPL29, RPS19, RPL32, RPL13A, RPL21, RPLP0, RPL8, RPL11, RPL37A, RPS21, UBA52</i>
Splisozom	4,91E+11	<i>TRA2B, SNRPD3, EFTUD2, SNRPD2, SF3A3, CTNNBL1, PRPF19, HNRNPK, DDX23, U2AF1, SNRPA, ACIN1, SNRNP70, HNRNPC, PRPF38B</i>
Amino asit biyosentezi	7,41E+09	<i>ALDOA, PKM, GLUL, TPI1, PYCR2, ALDH18A1, ACO2, IDH3B, TKT, PGK1, ENO1</i>
Endoplazmik retikulumda protein işleme	0.0019101223451922554	<i>P4HB, NPLOC4, PDIA3, UBE2G2, CALR, STT3B, HYOU1, UBE2D3, ATF4, STT3A, VCP, RPN2, EIF2AK2, DDOST</i>
Karbon Metabolizması	0.0022775038892326746	<i>ALDOA, PKM, DLST, GPI, TPI1, ACO2, IDH3B, TKT, OGDH, PGK1, ENO1</i>
Virial karsinogenez	0.003880368257314306	<i>ACTN4, IL6ST, DDB1, RBL1, ACTN1, HLA-E, PKM, CDC42, ATF4, YWHAH, HNRNPK, HIST2H2BE, YWHAQ, EIF2AK2, CHD4</i>
DNA replikasyonu	0.0044120296338123356	<i>MCM7, POLE3, POLD1, POLD2, MCM2, MCM5</i>
İnsan T Hücre Lösemi Virüsü Tip-1 (HTLV-1) Enfeksiyonu	0.005035837095994682	<i>DVL2, EGRI, DVL3, TLN1, CD3G, SLC25A5, TGFB2, FDPS, SMAD3, CALR, MYBL2, HLA-E, AKT1, ATF4, POLE3, POLD1, POLD2</i>
Sitrat Döngüsü	0.01242351292748825	<i>DLST, ACO2, IDH3B, ACLY, OGDH</i>

(TCA döngüsü)		
Adherens junction	0.02081147194441041	<i>ACTG1, CDC42, IGF1R, ACTN4, TGFBR2, SMAD3, ACTN1</i>
Hücre Döğüsü	0.03553343986130119	<i>MCM7, YWHAH, RBL1, YWHAQ, SMAD3, MCM2, ABL1, MCM5, CDC25B</i>
Hippo Sinyal Yolağı	0.041162972656703156	<i>DVL2, ACTG1, DVL3, PPP1CA, MOB1A, YWHAH, TGFBR2, YWHAQ, SMAD3, SMAD1</i>
Fokal Adhezyon	0.05023889916732939	<i>ACTG1, AKT1, CDC42, IGF1R, TLN1, PPP1CA, ACTN4, DIAPH1, ACTN1, ITGA4, BIRC3, FLNA, ALDOA, GALNT2, NDUFB4, AHCY, ALDH18A1, POLR2E, GCLC, HMGCR, ATP5G2, CAD, QARS, PPT1, OGDH, ATP5G3, PKM, STT3B, TPI1, STT3A, ST3GAL5, POLE3, PLCH1, ATP5L, RPN2, ITPK1, DDOST, IMPDH2, ENO1, DLST, ACO2, CMAS, FDPS, IDH3B, ACLY, TKT, DGKH, GPI, GLUL, PYCR2, NDUFV1, POLD1, POLD2, DNMT1, ATP5A1, EXT1, PGK1, SMPD4, ALOX12, UQCRB</i>
Metabolik Yolaklar	0.052734349834284586	
Glikoliziz / Gluconeogenez	0.05314025984058822	<i>ALDOA, PKM, GPI, TPI1, PGK1, ENO1</i>
Kronik Myeloid Lösemi	0.06829646324496438	<i>AKT1, CTBP1, CBLB, BCR, TGFBR2, ABL1</i>
Lökosit Transendotelial Göç	0.06876340700111763	<i>ACTG1, CDC42, ITK, ACTN4, CXCR4, ACTN1, ITGA4, RHOH</i>

Hücre hatları için yaptığımız analizler, veri tabanlarından elde edilen 12 adet T-ALL hastasına ait RNA dizileme sonuçları verisinde de uygulandı ve elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda 1200 adet gene ait gen anlatım profilleri, ısı haritalarına yerleştirilip gen anlatım düzeyleri görselleştirildi (Şekil 21). Hasta grubunun, kontrol örneği olan timus havuzundan farklı bir anlatım profili gösterdiği, ısı haritasında herhangi bir etiketleme yapılmadan kümelenmesi ile gösterilmiştir.

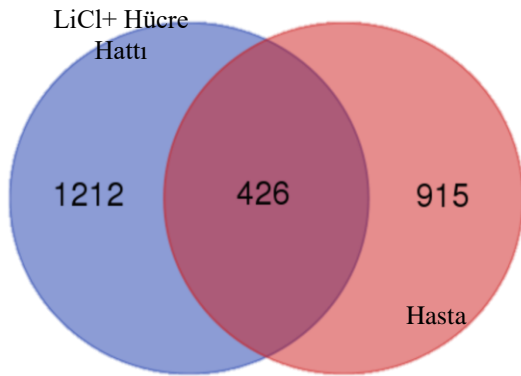


Şekil 21: Hasta verilerinde, tüm transkriptom analizinin gen anlatım ısı grafiği. . “H” kodları hasta örnekleri, “THY” kodları kontrol timus havuzunu temsil etmektedir.

Hem uyarılmış hücre hatlarına ait veriler hem de hastalardan elde edilen veriler birleştirildiğinde, 426 adet genin ortak profil gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 22). Logaritmik kat değişim verilerine göre en anlamlı artışı ve azalışı gösteren 10 gen Tablo 13’te gösterilmiştir.

Tablo 13: Uyarılmış hücre hatları ve hastalarda ortak çıkan genlerden en anlamlı artışı ve azalışı gösteren 10 gen.

Gen Adı	Log Kat Değişimi (Anlatımı arttanlar)	Gen Adı	Log Kat Değişimi (Anlatımı azalanlar)
<i>VATI</i>	6.113	<i>ZNF736</i>	-5.364
<i>DDOST</i>	5.938	<i>CIQTNF6</i>	-5.367
<i>TLN1</i>	5.395	<i>CASC1</i>	-5.384
<i>RPL8</i>	5.383	<i>GVINP1</i>	-5.397
<i>CFLI</i>	5.329	<i>BACH2</i>	-5.732
<i>P4HB</i>	5.070	<i>RPL21</i>	-6.091
<i>PKM</i>	4.962	<i>OMG</i>	-6.132
<i>RPLP0</i>	4.384	<i>IPCEF1</i>	-6.231
<i>TAGLN2</i>	4.815	<i>SLFN5</i>	-7.077
<i>RPS21</i>	5.509	<i>MALAT1</i>	-7.554



g

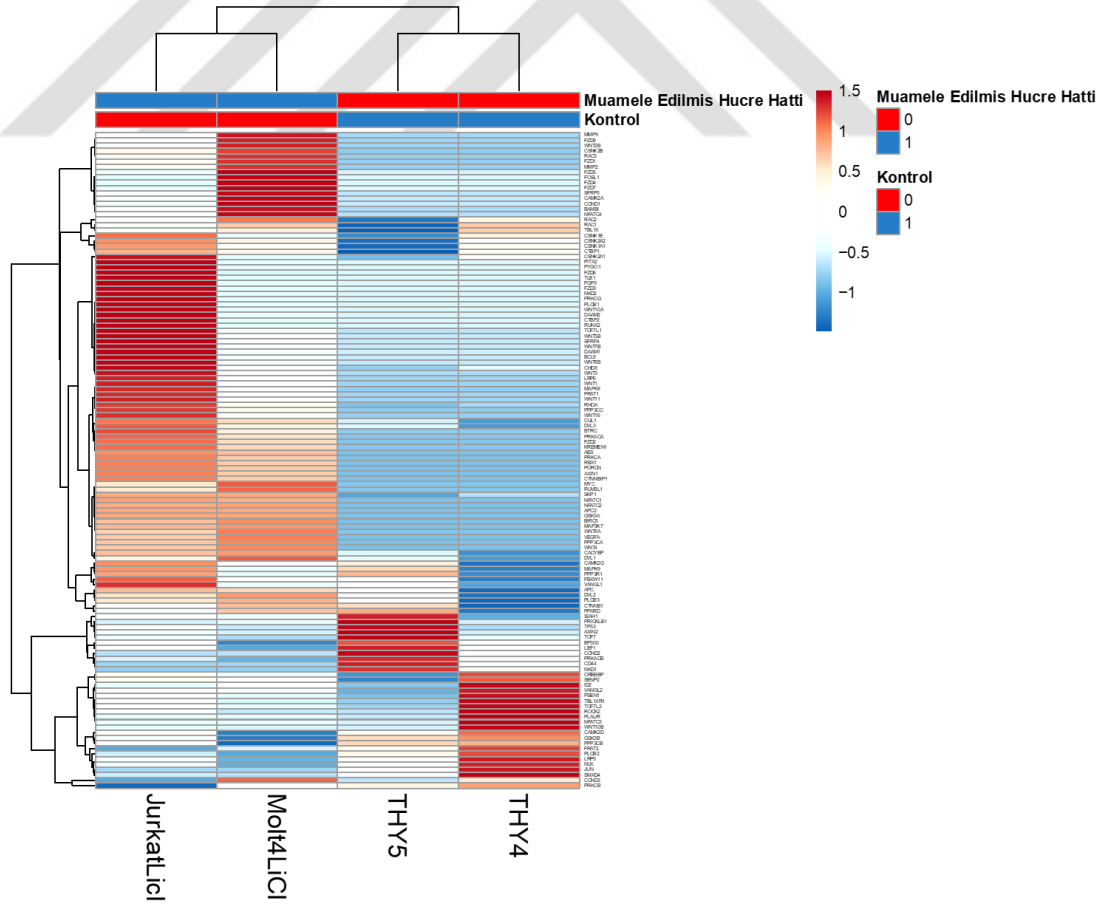
Şekil 22: Tüm transkriptom analizi sonucu, LiCl ile muamele edilmiş hücre hattı ve hastalardaki gen anlatım profillerinin kesişim kümesi (n=426).

4.2.5. WNT Yolağı Özelinde Gen Anlatım Analizi

Seçilmiş olan en uygun yöntem olan STAR hizalama aracı ve EBSeq hesaplamama aracını kullanarak verilerimizin içinden WNT yolağına ait genleri çekip bunlar arasında farklı anlatım profili gösteren 60 gen tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Tespit edilen 60 gene ait gen anlatım profilleri, ısı haritalarına yerleştirilip gen anlatım düzeyleri görselleştirilmiştir (Şekil 23). LiCl muamelesi görmüş hücre hatlarının, kontrol örneği olan timus havuzundan farklı bir anlatım profili gösterdiği, ısı haritasında herhangi bir etiketleme yapılmadan kümelenmesi ile gösterilmiştir.

Bu genlere ait logaritmik kat değişim değerleri Tablo 14'de anlatımı artan ve azalan genler olarak ikiye ayrılarak, logaritmik kat değişim değerleri gösterilmiştir.



Şekil 23. WNT yolağı özelinde yapılan gen analizinde ısı grafiği.

Tespit edilen genlerin dahil oldukları diğer yolaklar, Tablo 15’de gösterilmiştir.

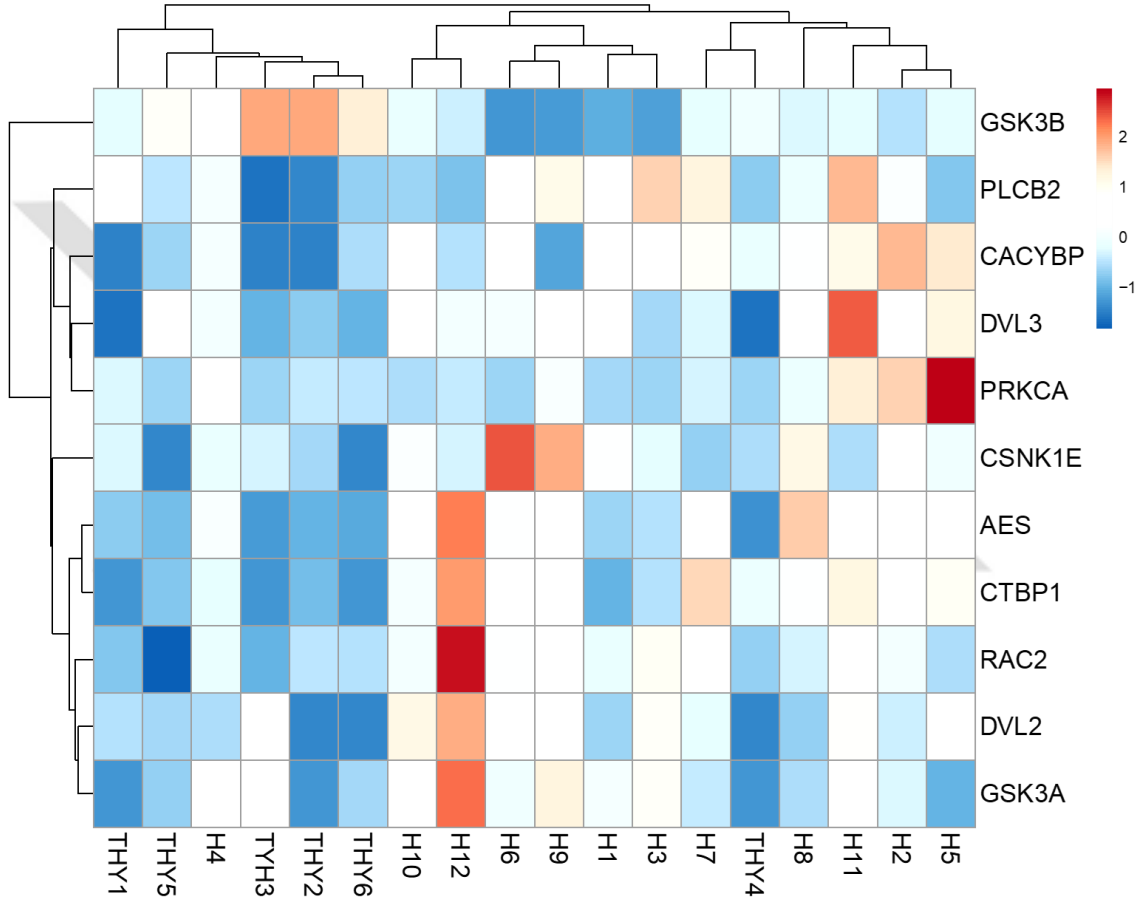
Tablo 14: WNT yolağı özelinde yapılan gen analizinde anlatımı değişen genler ve değişim katsayıları (p<0.05).

Anlatımı Artan Genler		Anlatımı Azalan Genler	
Gen	Log2 Kat Değişimi	Gen	Log2 Kat Değişimi
<i>CUL1</i>	3.128267648	<i>NKD1</i>	-9.840906974
<i>DVL1</i>	3.042854466	<i>CD44</i>	-7.914402021
<i>DVL3</i>	2.961719281	<i>WNT10B</i>	-4.17621265
<i>DVL2</i>	2.205929211	<i>ABCB1</i>	-4.017064497
<i>SKP1</i>	2.15823265	<i>PRICKLE1</i>	-3.734768494
<i>CSNK1A1</i>	2.061712158	<i>AXIN2</i>	-3.334996218
<i>CTBP1</i>	2.061488527	<i>JUN</i>	-2.825509998
<i>RHOA</i>	1.889675525	<i>PLAUR</i>	-2.787823641
<i>PLCB3</i>	1.776622647	<i>TCF7</i>	-2.690464419
<i>FBXW11</i>	1.693612589	<i>PRKACB</i>	-2.62086233
<i>APC</i>	1.561184901	<i>CCND2</i>	-2.616505349
<i>CACYBP</i>	1.39892168	<i>SMAD4</i>	-2.502346355
<i>VANGL1</i>	1.360051777	<i>PLCB2</i>	-1.982548804
<i>CAMK2G</i>	0.93676577	<i>TP53</i>	-1.900874465
<i>CSNK1E</i>	0.905523303	<i>FRAT2</i>	-1.746983442
<i>CTNNB1</i>	0.88983256	<i>LEF1</i>	-1.738377439
<i>TBL1X</i>	0.794394944	<i>CAMK2D</i>	-1.719613231
<i>RAC1</i>	0.762008879	<i>TCF7L2</i>	-1.441869812
<i>MAPK9</i>	0.738546712	<i>ID2</i>	-1.095308459
<i>RAC2</i>	0.648378322	<i>GSK3B</i>	-1.084755191
<i>CSNK2A1</i>	0.563911176	<i>NFATC3</i>	-1.076625527
<i>PPARD</i>	0.520334467	<i>ROCK2</i>	-1.052621197
<i>CSNK2A2</i>	0.519315129	<i>PSEN1</i>	-0.916124087
<i>CHD8</i>	0.477381504	<i>PPP3CB</i>	-0.842438256
<i>PPP3R1</i>	0.196906816	<i>PRKCB</i>	-0.717742279
<i>SENP2</i>	0.093144361	<i>NLK</i>	-0.656428465
<i>CCND3</i>	0.078221116	<i>VANGL2</i>	-0.645343909
		<i>EP300</i>	-0.636510873
		<i>LRP5</i>	-0.573433196
		<i>SIAH1</i>	-0.532406682
		<i>TBL1XR1</i>	-0.526357711
		<i>CREBBP</i>	-0.038183942

Tablo 15: Uyarılmış hücre hatları ve hasta grubunda ortak anlatımı değişen WNT genlerinin dahil oldukları diğer yollar.

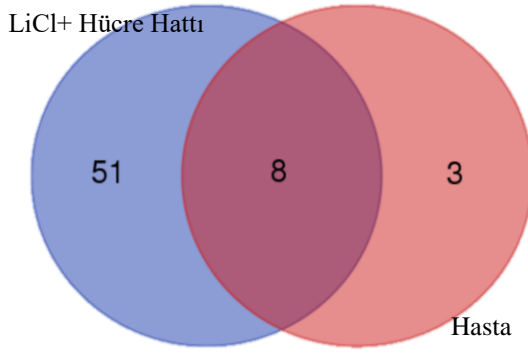
Yolak Adı	P Değeri	Genler
Ribozom	3,96E+07	<i>RPSA, RPL19, RPL14, RPL13, RPL27A, RPL26, RPL35, RPL37, RPL38, RPS2, RPL29, RPS19, RPL32, RPL13A, RPL21, RPLP0, RPL8, RPL11, RPL37A, RPS21, UBA52</i>
Splisozom	4,91E+11	<i>TRA2B, SNRPD3, EFTUD2, SNRPD2, SF3A3, CTNNBL1, PRPF19, HNRNPK, DDX23, U2AF1, SNRPA, ACIN1, SNRNP70, HNRNPC, PRPF38B</i>
Amino asit biyosentezi	7,41E+09	<i>ALDOA, PKM, GLUL, TPI1, PYCR2, ALDH18A1, ACO2, IDH3B, TKT, PGK1, ENO1</i>
Endoplazmik retikulumda protein işleme	0.0019101223451922554	<i>P4HB, NPLOC4, PDIA3, UBE2G2, CALR, STT3B, HYOU1, UBE2D3, ATF4, STT3A, VCP, RPN2, EIF2AK2, DDOST</i>
Karbon Metabolizması	0.0022775038892326746	<i>ALDOA, PKM, DLST, GPI, TPI1, ACO2, IDH3B, TKT, OGDH, PGK1, ENO1</i>
Viral karsinogenez	0.003880368257314306	<i>ACTN4, IL6ST, DDB1, RBL1, ACTN1, HLA-E, PKM, CDC42, ATF4, YWHAH, HNRNPK, HIST2H2BE, YWHAQ, EIF2AK2, CHD4</i>
DNA replikasyonu	0.0044120296338123356	<i>MCM7, POLE3, POLD1, POLD2, MCM2, MCM5</i>
İnsan T Hücre Lösemi Virüsü Tip-1 (HTLV-I) Enfeksiyonu	0.005035837095994682	<i>DVL2, EGR1, DVL3, TLN1, CD3G, SLC25A5, TGFBR2, FDPS, SMAD3, CALR, MYBL2, HLA-E, AKT1, ATF4, POLE3, POLD1, POLD2</i>
Sitrat Döngüsü (TCA döngüsü)	0.01242351292748825	<i>DLST, ACO2, IDH3B, ACLY, OGDH</i>
Adherens junction	0.02081147194441041	<i>ACTG1, CDC42, IGF1R, ACTN4, TGFBR2, SMAD3, ACTN1</i>
Hücre Döngüsü	0.03553343986130119	<i>MCM7, YWHAH, RBL1, YWHAQ, SMAD3, MCM2, ABL1, MCM5, CDC25B</i>
Hippo Sinyal Yolu	0.041162972656703156	<i>DVL2, ACTG1, DVL3, PPP1CA, MOB1A, YWHAH, TGFBR2, YWHAQ, SMAD3, SMAD1</i>
Fokal Adhezyon	0.05023889916732939	<i>ACTG1, AKT1, CDC42, IGF1R, TLN1, PPP1CA, ACTN4, DIAPH1, ACTN1, ITGA4, BIRC3, FLNA</i>
Metabolik Yollar	0.052734349834284586	<i>ALDOA, GALNT2, NDUFB4, AHCY, ALDH18A1, POLR2E, GCLC, HMGCR, ATP5G2, CAD, QARS, PPT1, OGDH, ATP5G3, PKM, STT3B, TPI1, STT3A, ST3GAL5, POLE3, PLCH1, ATP5L, RPN2, ITPK1, DDOST, IMPDH2, ENO1, DLST, ACO2, CMAS, FDPS, IDH3B, ACLY, TKT, DGKH, GPI, GLUL, PYCR2, NDUFV1, POLD1, POLD2, DNMT1, ATP5A1, EXT1, PGK1, SMPD4, ALOX12, UQCRB</i>
Glikoliz / Gluconeogenez	0.05314025984058822	<i>ALDOA, PKM, GPI, TPI1, PGK1, ENO1</i>
Kronik Myeloid Lösemi	0.06829646324496438	<i>AKT1, CTBP1, CBLB, BCR, TGFBR2, ABL1</i>
Lökosit Transendotelial Göç	0.06876340700111763	<i>ACTG1, CDC42, ITK, ACTN4, CXCR4, ACTN1, ITGA4, RHOH</i>

Hasta verisinden elde ettiğimiz 11 adet genin anlatım profilleri, ısı haritalarına yerleştirilip gen anlatım düzeyleri görselleştirilmiştir (Şekil 24). Hasta grubunun, kontrol örneği olan timus havuzundan farklı bir anlatım profili gösterdiği, ısı haritasında herhangi bir etiketleme yapılmadan kümelenmesi ile gösterilmiştir.



Şekil 24: WNT yolağı özelinde yapılan gen analizinde ısı grafiği.

Hem uyarılmış hücre hatlarına ait veriler hem de hastalardan elde edilen veriler birleştirildiğinde, 8 adet genin ortak profil gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 25).



Şekil 25: WNT yolağı özelinde yapılan analiz sonucu, LiCl ile muamele edilmiş hücre hattı ve hastalardaki gen anlatım profillerinin kesişim kümesi (n=8).

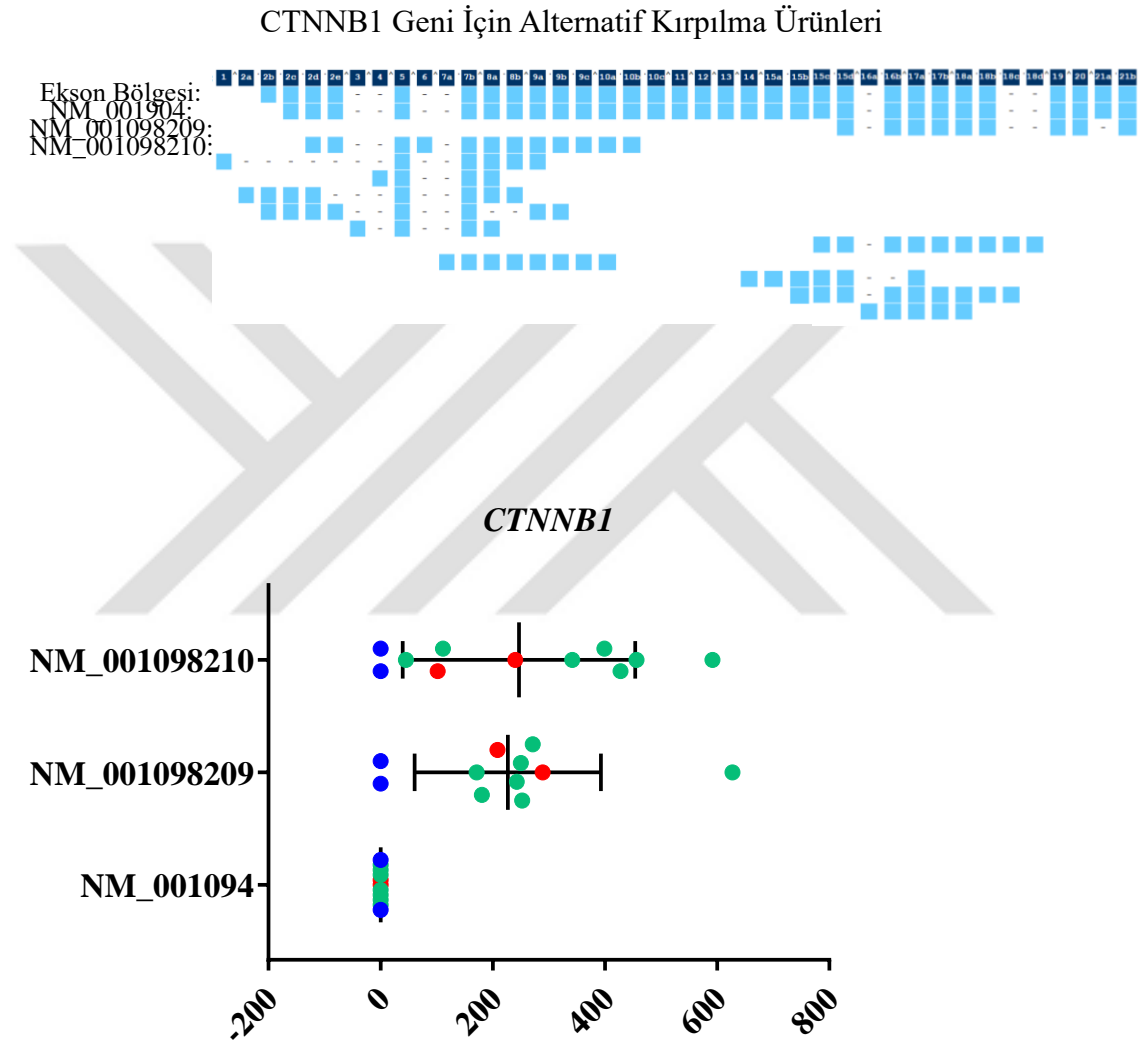
Tespit ettiğimiz sekiz genden beşinin WNT yolağındaki görevleri tespit edilmiştir ve Tablo 16’de gösterilmiştir.

Tablo 16. Uyarılmış hücre hatları ve hastalarda ortak çıkan Wnt yolağı genlerinin dahil oldukları yollar.

Dahil olduğu Wnt yolağı	Genler
β -Katenin Yıkım kompleksinin bozulması	<i>DVL2, DVL3, GSK3β</i>
Kanonik Wnt sinyalizasyon yolağı	<i>DVL2, DVL3, GSK3β</i>
Wnt aracılığı ile Hücre-Hücre sinyalizasyonu	<i>DVL2, DVL3, GSK3β, CSNK1E, PLCB2</i>
Hücre yüzey reseptörleri sinyalizasyonu	<i>DVL2, DVL3, GSK3β, CSNK1E, PLCB2</i>

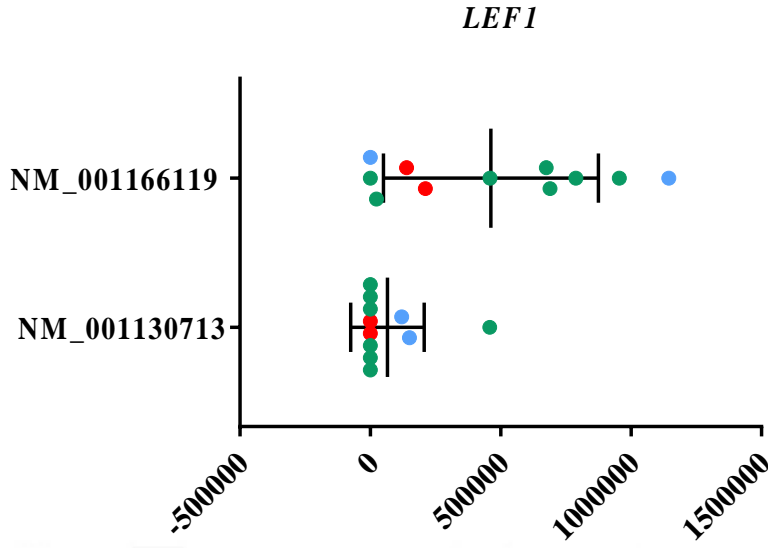
4.2.6. Alternatif Kırpılma Ürünleri

WNT sinyal yolağı için kilit rolü olan genlerin alternatif kırpılma ürünlerinin anlatımları hesaplanmıştır.



Şekil 26: *CTNNB1* için alternatif kırpılma ürünlerinin örneklerle göre değişen anlatım düzeyleri. NCBI veritabanında *CTNNB1* için tanımlanmış alternatif kırpılma ürünleri ve boyutları gösterilmiştir. *CTNNB1* NM_001904, NM_001098210 ve NM_001098209 ürünlerinin örneklerle göre değişen anlatım düzeyleri. Kırmızı semboller uyarılmış hücre hatlarını, yeşiller hastaları ve maviler de kontrol örneklerini temsil etmektedir.

CTNNB1 için veritabanlarında tanımlanmış üç transkript tespit edilmiş ve bunların anlatım düzeyleri Şekil 26'da gösterilmiştir.

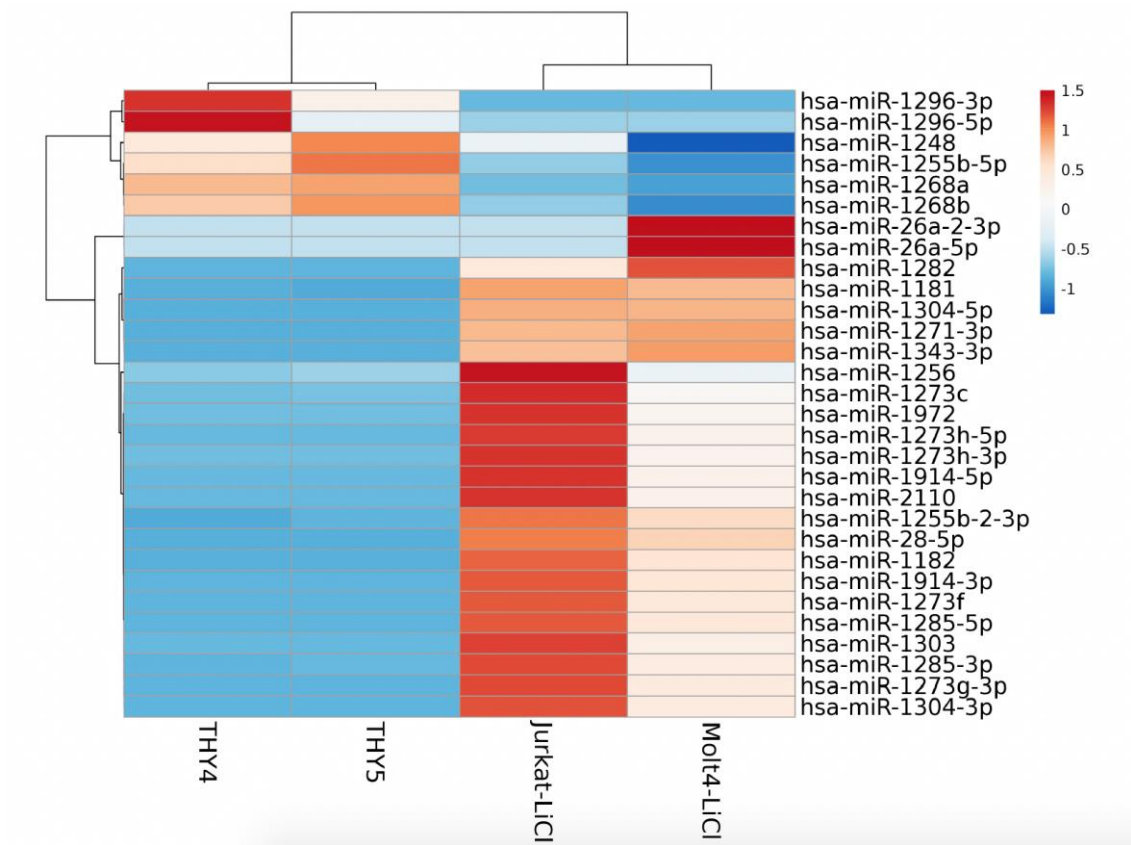


Şekil 27: *LEF1* için alternatif kırılma ürünlerinin örneklere göre değişen anlatım düzeyleri. NCBI veritabanında *LEF1* için tanımlanmış alternatif kırılma ürünleri ve boyutları gösterilmiştir. NM_001166119 ve NM_001130713 ürünlerinin örneklere göre değişen anlatım düzeyleri. Kırmızı semboller uyarılmış hücre hatlarını, yeşiller hastaları ve maviler de control örneklerini temsil etmektedir.

LEF1 için veritabanlarında tanımlanmış iki transkript tespit edilmiş ve bunların anlatım düzeyleri Şekil 27’de gösterilmiştir.

4.2.7. miRNA Analizleri

mRNA tabanlı analizlere ek olarak, dizilenen veriden miRNA dizilerini çekerek miRNA için anlatım analizleri gerçekleştirildi. İstatistiksel olarak anlamlı düzeyde anlatımının değiştiğini tespit ettiğimiz 30 adet miRNA, ısı haritasında görselleştirildi. LiCl ile muamele edilmiş hücre hatlarının miRNA anlatımı açısından da kontrol timus havuzlarından farklı bir gen anlatımı gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 28). Tespit edilen bu 30 miRNA’ya ait logaritmik kat değişim değerleri Tablo 17’de gösterilmiştir.



Şekil 28: miRNA analizinde anlatım farklılığı gösteren miRNA'larının ısı haritası.

Tablo 17: Anlatımı değişen miRNA'lar ve değişim katsayıları.

Anlatımı Artan miRNA'lar		
miRNA	Log2 Kat Değişimi	P-değeri
<i>hsa-miR-1296-3p</i>	5.32597704	0.039613019
<i>hsa-miR-1296-5p</i>	5.304018956	0.041204879
<i>hsa-miR-1268a</i>	4.045626497	5.68708E-25
<i>hsa-miR-1255b-5p</i>	3.41100313	1.25952E-11
<i>hsa-miR-1268b</i>	2.831211339	1.87564E-07
<i>hsa-miR-1248</i>	2.475449399	0.017662463

Anlatımı Azalan miRNA'lar

miRNA	Log2 Kat Değişimi	P- Değeri
<i>hsa-miR-1273h-5p</i>	-9.979892465	3.12486E-07
<i>hsa-miR-1304-5p</i>	-8.949644786	1.07512E-05
<i>hsa-miR-1304-3p</i>	-8.816609293	1.62057E-05
<i>hsa-miR-1303</i>	-8.365201484	6.16371E-05
<i>hsa-miR-1271-3p</i>	-7.933272137	0.000198147
<i>hsa-miR-1273h-3p</i>	-7.913895689	0.000209346
<i>hsa-miR-1273f</i>	-7.750713888	3.61746E-59
<i>hsa-miR-28-5p</i>	-5.887742851	0.013913218
<i>hsa-miR-1182</i>	-5.875153466	0.014198579
<i>hsa-miR-26a-5p</i>	-5.756546584	0.021259753

Anlatımı değişen miRNA'lar Python dilinde yazılan bir kod ile veritabanlarından hedefledikleri genler ile eşleştirildi ve Tablo 18'de gösterildi.

Tablo 18: Anlatımı değişen miRNA'lar ve değişim katsayıları.

miRNA	log2Fold Change	Hedef Genleri
<i>hsa-miR-26a-5p</i>	-5.756546584	<i>CTNNBIP1, GSK3B, TCFL2, WNT5A, CCND2, PPP3R1, FRAT1, FRAT2, NLK, PLCB1, SMAD4, PPP3CB, VANGL2, PRKCB, LEF1, CREBBP</i>
<i>hsa-miR-2110</i>	-5.224979337	<i>WNT5A, PRKCG, WNT8B</i>

<i>hsa-miR-1972</i>	-5.357538039	<i>FZD6, WIF1, FOSL1, PRKACB</i>
<i>hsa-miR-1914-5p</i>	-5.423519876	<i>GSK3B, SFRP1, WNT9A</i>
<i>hsa-miR-1914-3p</i>	-5.104450525	<i>VANGL1, NFATC2, LEF1, TCF7</i>
<i>hsa-miR-1343-3p</i>	-5.2644177	<i>PLCB1</i>
<i>hsa-miR-1304-5p</i>	-8.949644786	<i>MYC, WNT3A</i>
<i>hsa-miR-1296-5p</i>	5.304018956	<i>CAMK2G, WNT5B</i>
<i>hsa-miR-1285-5p</i>	-4.564880439	<i>FZD3</i>
<i>hsa-miR-1285-3p</i>	-3.037665848	<i>BTRC, TP53, PLCB1</i>
<i>hsa-miR-1273h-5p</i>	-9.979892465	<i>DVL1, CSNK2A1, WNT9B</i>
<i>hsa-miR-1273h-3p</i>	-7.913895689	<i>DKK2</i>
<i>hsa-miR-1273g-3p</i>	-3.233505778	<i>WNT16, FZD3, VANGL2</i>
<i>hsa-miR-1273f</i>	-7.750713888	<i>SFRP4, RUVBL1</i>
<i>hsa-miR-1255b-2-3p</i>	-4.233325298	<i>MAPK8, WNT9B</i>

4.2.8. Varyant Analizleri

Yöntemimizin doğruluğunu gösterebilmek adına seçilen hücre hatlarında daha önce tanımlanmış varyasyonlar RNA dizileme yöntemi ile da analiz edildi. Jurkat hücre hattı için literatürde tanımlanan 12. kromozomda lokalize olmuş *CDK4* ve 1. kromozomda lokalize olmuş *ARF1* gen varyasyonları; Molt4 hücre hattı için literatürde tanımlanan 1. kromozomda lokalize olmuş *NRAS* ve yine 1. kromozomda lokalize olmuş *ARF1* genindeki varyasyonlar tespit edilmiştir (Şekil 29).

Bu varyasyonlara ek olarak WNT yolağında görevli genler, T hücre gelişiminden sorumlu genler ve lösemiler için tanımlanmış genlerin varyasyonları da çalışma örneklerinde gösterildi (Şekil 30).

Name	Gene ID	Chr	Start	Stop	Disease	Description	Length	Num Variants	Num Alleles	PubMed	Paternal Variants
CDK4	1019	12	58141510	58146230	Melanoma, cutaneous malignant 3	cyclin-dependent kinase 4	4721	1	1	CDK4	0
ARF	375	1	228270361	228286913		ADP-ribosylation factor 1	16553	1	1	ARF1	0
BCR	613	22	23522552	23660224	Acute lymphoid leukemia	breakpoint cluster region	137673	2	2	BCR	
PICALM	8301	11	85668214	85780923	Alzheimer's disease	phosphatidylinositol binding clathrin assem...	112710	2	2	PICALM	
MLLT10	8028	10	21823101	22032559	AML - Acute myeloid leukemia	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemi...	209459	1	1	MLLT10	
NPM1	4869	5	170814708	170837888	AML - Acute myeloid leukemia	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein ...	23181	1	1	NPM1	
RUNX1	861	21	36160098	36421595	AML - Acute myeloid leukemia	runx-related transcription factor 1	261498	3	3	RUNX1	

Name	Gene ID	Chr	Start	Stop	Disease	Description	Length	Num Variants	Num Alleles	PubMed	Paternal Variants
					T cell						
PTPRC	5788	1	198608098	198726605	Severe combined immunodeficiency	protein tyrosine phosphat...	118508	1	1	PTPRC	0
CD3D	915	11	118209789	118213459	Severe combined immunodeficiency	CD3d molecule, delta (CD...	3671	1	1	CD3D	0
CD3E	916	11	118175295	118186890	Severe combined immunodeficiency	CD3e molecule, epsilon (C...	11596	1	1	CD3E	0

Gene View

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Variant Length	Type	Genotype	Exonic
DVL1	A>A/G	1	1271175	1	snv	het	yes
VANGL1	A>A/G	1	116234313	1	snv	het	yes
VANGL1	C>C/T	1	116235476	1	snv	het	yes
PPP3R1	A>A/G	2	68407926	1	snv	het	yes
CTBP1	C>C/A	4	1219311	1	snv	het	yes
TCF7	G>G/A	5	133482348	1	snv	het	yes
CSNK2B	T>T/C	6	31635710	1	snv	het	yes
CSNK2B	C>C/A	6	31637110	1	snv	het	yes
CCND3	A>A/C	6	41903782	1	snv	het	yes
MAP3K7	A>A/T	6	91224917	1	snv	het	yes
MYC	A>A/G	8	128748389	1	snv	het	yes
MYC	C>C/T	8	128748687	1	snv	het	yes
TLE1	G>G/A	9	84200493	1	snv	het	yes
LRP6	T>T/C	12	12272054	1	snv	het	yes
CHD8	C>C/T	14	21863153	1	snv	het	yes
CHD8	A>A/G	14	21863492	1	snv	het	yes
AXIN1	T>T/C	16	339590	1	snv	het	yes
PRKCB	C>C/T	16	23847622	1	snv	het	yes
BIRC5	C>C/A	17	76219829	1	snv	het	yes
AES	T>C/C	19	3053574	1	snv	hom	yes
GSK3A	G>G/T	19	42738756	1	snv	het	yes

Şekil 29: A) Jurkat hattında *CDK4* ve *ARF1* varyantının gösterimi. B) Lösemiler için bilinen varyantların Jurkat hücre hattında gösterimi. C) T hücre için bilinen varyantların Jurkat hücre hattında gösterimi. D) WNT yolağıdaki genlerde tespit edilen varyantlar.

Gene View

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Variant Length	Type	Genotype	Exonic	Filters	Quality	GQX	Alternate Alleles	Inherited From	Alt Variant Freq	Read
NRAS	TA>TA/T	1	115247749	1	deletion	het	yes	PASS	457	457	1		24,19	
NRAS	G>G/A	1	115249843	1	snv	het	yes	PASS	165	165	1		37,31	

Gene View

Name	Gene ID	Chr	Start	Stop	Disease	Description	Length	Num Variants	Num Alleles	PubMed	Paternal Variants
ARF1	375	1	228270361	228286513		ADP-ribosylation factor 1	16553	17	18	ARF1	0

Gene View

Name	Gene ID	Chr	Start	Stop	Disease	Description	Length	Num Variants	Num Alleles	PubMed
leukemia										
PTPN11	5781	12	112856536	112947717	Noonan's syndrom	protein tyrosine phosphat...	91182	8	8	PTPN11
CBL	867	11	119076986	119178859	Noonan syndrome	Cbl proto-oncogene, E3 u...	101874	21	22	CBL
NF1	4763	17	29421945	29704695	Neurofibromatosis	neurofibromin 1	282751	30	32	NF1
JAK2	3717	9	4985245	5128183	Myelofibrosis; AML	Janus kinase 2	142939	5	6	JAK2
NSD1	64324	5	176560080	176727214	Beckwith-Wiedem	nuclear receptor binding ...	167135	16	18	NSD1
TERT	7015	5	1253282	1295162	Aplastic anemia; A	telomerase reverse trans...	41881	11	11	TERT
GATA2	2624	3	128198265	128212030	AML - Acute myel	GATA binding protein 2	13766	24	41	GATA2
KIT	3815	4	55524095	55606881	AML - Acute myel	v-kit Hardy-Zuckerman 4 ...	82787	5	5	KIT
RUNX1	861	21	36160098	36421595	AML - Acute myel	runt-related transcription ...	261498	33	38	RUNX1
FLT3	2322	13	28577411	28674729	AML - Acute myel	fms-related tyrosine kina...	97319	3	3	FLT3
WHSC1L1	54904	8	38132560	38239790	AML - Acute myel	Wolf-Hirschhorn syndrom...	107231	16	17	WHSC1L1
SH3GL1	6455	19	4360364	4400415	AML - Acute myel	SH3-domain GRB2-like 1	40052	9	9	SH3GL1
NUP214	8021	9	134000981	134109091	AML - Acute myel	nucleoporin 214kDa	108111	69	76	NUP214
NPM1	4869	5	170814708	170837888	AML - Acute myel	nucleophosmin (nucleolar ...	23181	24	30	NPM1
MLLT10	8028	10	21823101	22032559	AML - Acute myel	myeloid/lymphoid or mixe...	209459	25	29	MLLT10
MLF1	4291	3	158288953	158324249	AML - Acute myel	myeloid leukemia factor 1	35297	6	10	MLF1
LPP	4026	3	187871663	188608460	AML - Acute myel	LIM domain containing pr...	736798	6	6	LPP
GMPS	8833	3	155588325	155655521	AML - Acute myel	guanine monophosphate s...	67197	3	3	GMPS
ETV6	2120	12	11802788	12048336	AML - Acute myel	ets variant 6	245549	16	18	ETV6
CHIC2	26511	4	54875956	54930815	AML - Acute myel	cysteine-rich hydrophobic...	54860	6	7	CHIC2
CEBPA	1050	19	33790840	33793430	AML - Acute myel	CCAAT/enhancer binding ...	2591	1	1	CEBPA
CBFB	865	16	67063050	67134961	AML - Acute myel	core-binding factor, beta ...	71912	14	14	CBFB
ARHGEF12	23365	11	120207618	120360645	AML - Acute myel	Rho guanine nucleotide e...	153028	6	6	ARHGEF12
PICALM	8301	11	85668214	85780923	Alzheimer's diseas	phosphatidylinositol bindi...	112710	47	59	PICALM
RARA	5914	17	38465423	38513895	Acute promyelocy	retinoic acid receptor, alpha	48473	9	9	RARA
BCR	613	22	23522552	23660224	Acute lymphoid lei	breakpoint cluster region	137673	28	38	BCR

Gene View										
Name	Gene ID	Chr	Start	Stop	Disease	Description	Length	Num Variants	Num Alleles	PubMed
					t cell					
JAK3	3718	19	17935591	17958841	Severe combined i	Janus kinase 3	23251	1	1	JAK3
PTPRC	5788	1	198608098	198726605	Severe combined i	protein tyrosine phosphat...	118508	8	8	PTPRC
KCNJ11	3767	11	17406795	17410878	Diabetes mellitus t	potassium inwardly-rectif...	4084	1	1	KCNJ11
ABCC8	6833	11	17414432	17498449	Diabetes mellitus t	ATP-binding cassette, su...	84018	1	1	ABCC8

Gene View							
Gene	Variant	Chr	Coordinate	Variant Length	Type	Genotype	Exonic
DVL1	G>G/A	1	1284490	1	snv	het	yes
CTNNBIP1	A>A/T	1	9910357	1	snv	het	yes
CTNNBIP1	T>T/C	1	9910358	1	snv	het	yes
CACYBP	C>C/T	1	174969271	1	snv	het	yes
RHOA	T>T/A	3	49397284	1	snv	het	yes
DVL3	A>A/T	3	183889337	1	snv	het	yes
CSNK2B	G>G/A	6	31637236	1	snv	het	yes
CCND3	A>A/C	6	41903782	1	snv	het	yes
CCND3	G>G/A	6	41909332	1	snv	het	yes
VEGFA	A>A/G	6	43738912	1	snv	het	yes
VEGFA	C>C/T	6	43745577	1	snv	het	no
MAP3K7	T>T/A	6	91224407	1	snv	het	yes
FZD1	G>G/C	7	90893843	1	snv	het	yes
LRP5	G>G/A	11	68192690	1	snv	het	yes
CHD8	A>A/G	14	21896154	1	snv	het	yes
TP53,WRA...	T>T/C	17	7589604	1	snv	het	no
PRKCA	G>G/A	17	64804664	1	snv	het	yes
BIRC5	G>G/A	17	76219591	1	snv	het	yes
BIRC5	A>A/G	17	76221370	1	snv	het	yes
AES	A>A/G	19	3061768	1	snv	het	no
PRKACA	T>T/G	19	14203303	1	snv	het	yes
GSK3A	G>G/A	19	42746399	1	snv	het	yes

Şekil 30: A) Molt4 hücre hattında *NRAS* ve *ARF1* varyantının gösterimi. B) Lösemiler için bilinen varyantların Molt4 hücre hattında gösterimi. C) T hücre için bilinen varyantların Molt4 hücre hattında gösterimi. D) WNT yolağıdaki genlerde tespit edilen varyantlar.

5. TARTIŞMA

Yeni nesil RNA dizileme, son derece dinamik olan hücre ya da dokuya özgün transkriptom repertuarını belirlemede kullanılabilecek yeni bir teknolojidir. Yeni nesil RNA dizi analizi teknolojisi uygulamaları ile kanser genom çalışmaları yeni bir boyut kazanmıştır. RNA dizileme sayesinde gen anlatım profilleri, alternatif kırılma ürünleri ve varyasyonlar gibi genom değişiklikleri yüksek çözünürlükte tespit edilebilmenin yanında miRNA bağlanma bölgeleri gibi fonksiyonel verilerin de tespitine olanak sağlamaktadır.

WNT sinyal iletim yolağı; evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş olup (39) WNT proteinleri gelişim sürecindeki hücrelerin akıbetini, yaşamını, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenleyen ve embriyonik dönemde açık olan bir yoldur (2). WNT yolağı, hematopoetik kök hücreler ile gelişmekte olan T ve B lenfositlerinin olgunlaşma sürecinde rol oynamaktadır.

Çalışmamızda T-ALL'nin farklı dönemlerini temsil eden Jurkat ve Molt4 hücre hatlarını, hücre kültüründe lityum klorür (LiCl) ile muamele ederek WNT sinyal yolağının aktive edilmesini sağladık. LiCl'ün WNT kanonik yolağında yıkım kompleksinde görevli GSK3 β üzerinde inhibitör etkisi vardır. GSK3 β baskılanması sonucunda yıkım mekanizması da baskılanmış olur ve sitoplazmadaki β -katenin fosforillenip yıkıma uğramadığından yer değiştirerek çekirdeğe geçer ve WNT yolağı genlerinin anlatım programını aktive etmiş olur (40). LiCl aynı zamanda bir H3K4'e spesifik demetilaz olan LSD1'in anlatımını azaltarak epigenetik modülatör görevi görür (41).

Bu tez çalışmasında, WNT yolağı üzerindeki değişiklikleri transkriptom düzeyinde incelemeyi amaçladık. Bunun için ilk olarak, herhangi bir gen listesi belirlemeden yaptığımız tüm transkriptom analizi sonucunda, hem uyarılmış hücre hatlarından hem de hasta verilerinden 426 adet genin ortak olarak anlatımının değiştiğini belirledik. Tüm transkriptom analizlerimize bu ortak genlerle devam ettik.

Bu genlerin görev aldıkları yollar incelendiğinde, splisozom yolağına ait genlerin anlatımlarının değiştiğini belirledik. T hücre klonundan köken aldığı hatta zaman ilerledikçe T-ALL'ye dönüşebildiği (42) gösterilen Miyelodisplastik sendromu

ile splisozom yolağına ait genler, hastalık ve gen ilişkisini gösteren veritabanlarında ilişkilendirilmiştir (43,44).

Kanonik yolağına ait üyelerden *TCF7L2*, *NLK*, *CAMK2D* ve *PLAUR*'un anlatımlarının azaldığını tespit ettik. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, Lösemi Gen Atlası (45) veritabanından elde ettiğimiz bilgilere göre, Novershtern ve arkadaşları mikro-dizileme ile *TCF7L2* ve *NLK*'nin (46); Haferlach ve arkadaşları ise mikro-dizileme verisiyle *CAMK2D* ve *PLAUR*'un (47) anlatımlarının T-ALL'de azaldığını göstermişlerdir.

Grubumuzun önceki çalışmasında da gösterildiği gibi, T-ALL hastalarında WNT yolağının durumuna bakıldığında, hastaların sadece %20'lik bir kısmında kanonik yolağın aktif olduğu gösterilmiştir (7). Ancak kanonik olmayan yolakların bu hastalardaki durumu bilinmemektedir. Bu çalışma sonucunda anlatımı anlamlı olarak değişen WNT genleri arasında kanonik olmayan yolaklara ait genler de gözlenmiştir. Hücre polaritesinin düzenlendiği yolağına ait *VANGL2*, *PRICKLE1*, *DVL1*, *DVL2*, *DVL3*, *RHOA*, *RAC1*, *RAC2*, *ROCK2*, *MAPK9* ve WNT/Ca²⁺ yolağına ait *PLCB3*, *CAMK2A*, *PPP3CA*, *NFAT* genlerinin anlatımlarının anlamlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Son zamanlarda kanserlerde kanonik olmayan WNT yolakları üyelerinde genetik varyasyonlar ve gen anlatımı değişiklikleri bildirilmektedir.

Hücre hatları ve T-ALL hasta verilerinde ortak olarak saptadığımız WNT genlerin durumu değerlendirildiğinde her iki grupta da ortak çıkan sekiz gen tespit ettik. Bu genler içinden *CSNK1E*'nin anlatımının arttığını belirledik. Lösemi Gen Atlası'ndaki veriler doğrultusunda, Haferlach ve arkadaşlarının mikro-dizileme yöntemiyle n=2,096 örnekle yaptıkları çalışmada da *CSNK1E*'nin ALL t(1;19) anlatımı artarken sağlıklı kemik iliği kontrollerinde anlatımının azaldığı gösterilmiştir (47). Anlatımının azaldığını tespit ettiğimiz *PLCB2*'nin, yine aynı çalışmada Pro-B-ALL t(11q23)'de anlatımının azaldığı gösterilmiştir. Molt4 hücre hattı ile yapılan bir başka çalışmada da siRNA ile *RHOA*'nın baskılanmasının, *WNT5A* ile uyarılan hücre göçünü ve invazyonunu baskıladığını göstermişler (48). Sonuç olarak *RHOA* aktivasyonunun, *Wnt5A*'nın indüklediği yetişkin T-ALL hücre göçünden ve invazyonundan sorumlu olduğunu göstermişler (48).

RNA dizilemesinin avatajlarından birisi de alternatif kırılma ürünlerinin anlatım farklılıklarını saptamaktır. Zhao ve arkadaşlarının, içerisinde bizim de

kullandığımız Jurkat ve Molt4'ün de bulunduğu lösemi hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, *IKZF2* geninin farklı transkript ürünlerinin T hücre proliferasyonunda ve apoptozunda etkili olduğu gösterilmiştir (49). Adamia ve arkadaşlarının yayınladıkları derlemede de kırılma hatalarının malign dönüşümlere sebep olabileceği ve aday olarak belirlenen alternatif kırılma ürünlerinin özellikle ilaca dirençli klonların tedavisinde kullanılabileceği belirtilmiştir (50).

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz alternatif kırılma ürün sonuçlarına baktığımızda, *LEF1* için dört alternatif kırılma ürününden biri (NM_001130713) tümör baskılayıcı özellikteki transkript varyant, diğeri ise (NM_001166119) onkogenik özellikli transkript varyanttır. Elimizdeki verilerde, uyarılmış hücre hatlarında ve altı hastada tümör baskılayıcı özellikteki transkriptin hiç anlatıma girmediği, sadece bir hastada ve sağlıklı kontrol örneklerinde anlatımın görüldüğünü tespit ettik. Onkogenik özellikte olan transkriptin ise; uyarılmış hücre hatlarında, altı hastada ve Jurkat için kontrol örneğinde anlatımını belirledik. Literatürde, tespit ettiğimiz iki alternatif kırılma ürününün anlatımları hakkında bilgiye ulaşılamamıştır. Enstitümüzün arşivi ve açık veritabanlarından temin edeceğimiz daha fazla hasta örnekleri ile bu bulgu desteklenmelidir.

miRNA dizileme yöntemlerinde, olgunlaşmış mRNA'lardan kütüphane oluşturmak yerine, miRNA izolasyonu ile başlayan basamakla miRNA kütüphaneleri oluşturulacak bir iş akışı mevcuttur. Bu yöntem ek olarak, mRNA tabanlı dizilemelerde de miRNA'lara ait olma ihtimali yüksek diziler, işlenmemiş veriden çekilerek hizalama işlemi yeniden bu diziler için uygulanarak da değerlendirmeler yapılabilir. Biz de bu tez çalışmamızda mRNA tabanlı dizilediğimiz örneklerimizde alternatif yöntemi kullanarak, tüm transkriptom verisinden miRNA'lara ait diziler çekip miRNA analizleri gerçekleştirildi. Anlatımı değişen miRNA'ları hedefledikleri WNT yolağına ait genler ile eşleştirdiğimizde en çok hedef geni bulunan miRNA olarak *hsa-miR-26a-5p*'yi tespit ettik. Hedeflediği genler arasından kanonik ve kanonik olmayan WNT yolağında kilit rolü olan genlerin olduğu dikkat çekmektedir. Farelerle yapılan bir çalışma sonucunda, *miR-26a-5p*'nin Wnt yolağını *WNT5A* üzerinden etkilediği ve kanonik olmayan yollardan Wnt/Ca⁺²'yi etkilediği gösterilmiştir (51). Bu bulguya ek olarak, T-ALL ve timositler üzerinde etkili olan kodlamayan RNA'ları derleyen bir yayında da *miR-26a-5p* T-ALL ile ilişkilendirilmiştir (22).

Anlatımı değişen miRNA'ları hedefledikleri WNT yolağına ait genler ile eőleőtirđimizde dikkat çeken bir diğer nokta da, anlatımı artan tek miRNA'nın *hsa-miR-1296-5p* olduğudur. Bundan dolayı, *miR-1296-5p*'nin tümör baskılayıcı özelliği olabileceğini düőündürmüőtür. Literatür taraması yapıldığında ise, Shan ve arkadaşlarının 2017 yılında, 106 mide kanseri hastası ve 30 kontrol örneği ile EZ-PZT kullanarak miRNA analizi sonuçlarını yayınladıkları çalıőmalarında, gastrik kanseri için yeni bir tümör baskılayıcı terapötik olabileceği vurgulanmıőtır (52).

miRNA'da elde ettiğimiz iki önemli bulgunun yanında, anlatımlarının deđiőtini tespit ettiğimiz miRNA'ların özellikle kanonik olmayan Wnt yolaklarını ve kök hücreleri hedeflediklerini gösterdik.. Farelerle yapılan bir çalışmada, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde (fAMKH), *mir-26a-5p*'nin regülasyonunun artması *WNT5A*'nın 3'UTR bölgesini hedefleyerek fMKH'ların osteojenik farklılaşmasını inhibe ettiği ve Wnt/Ca⁺² yolağının regülasyonunu azalttığı gösterilmiştir (51). Bir başka çalışmada ise, kendi geliőtirdikleri bir tahmin algoritması ile *mir-1273h-5p*'nin epitel-mezenkimal geçiő ile sorumlu genlerinden *AJUBA*, *LMO4*, *RHOB*, *SOX10*, *SOX5*, *SOX9*, *TEAD1*, *TP73*, *ZEB2*'yi hedeflediği gösterilmiştir (53). Bu miRNAların hastalardaki durumu bilinmediğinden dolayı, elde ettiğimiz miRNA bulgularının geniő bir hasta grubunda incelenmesi, aday bir teröpatik geliőtirilmesi açasından önemli olacaktır.

Varyant analizlerinde Lösemi ve Lenfoma Hücre Hatları'na ait genetik özelliklerin belirtildiği kitapta Jurkat için *CDK4* ve *ARF1*; Molt4 için de *NRAS* ve *ARF1* genlerindeki tanımlanmıőt varyasyonlar tespit edilmiştir (54). Böylece yaptığımız ön çalıőmalarla belirlediğimiz iş akış protokollerimizin doğruluğunu gösterebildik. Bu bulguya ek olarak, Tomov ve arkadaşlarının 2016 yılında yayınladıkları makalede, RNA Dizileme analizlerinde kullandıkları algoritma öncelikle ham verinin FASTQC aracıyla kalite kontrolünün tespitiyle başlamaktadır; ardından veriler hizalanıp bizim de kullandığımız EBSeq aracı ile gen anlatım düzeyleri hesaplanmıőt ve logaritma 2 tabanındaki artış miktarları gösterilmiştir (55). Buradan elde edilen gen listeleri doğrultusunda DAVID'de gen ontoloji analizleri tamamlanmıőtir. Bu algoritma bizim çalıőmamız için belirlediğimiz algoritma ile birebir örtüőmektedir ve iş akış protokollerimizin doğruluğu bir farklı yoldan da gösterilmiştir.

RNA dizileme yöntemi, gen anlatım analizleri için yüksek hassasiyetteki mikro-dizileme yöntemini geçersiz kılacak kadar güçlü bir transkriptom analiz yöntemi olarak karşımıza çıkmıştır. Analizlerinin göreceli olarak daha kolay olduğu mikro-dizi yöntemi, anlatımları anlamlı düzeyde değişen genlerin tespiti için çoğu çalışmada hala tercih edilen bir yöntemdir. RNA dizileme analizleri ise, araştırmacıların analiz yapmak için bir çok aracı kombine bir şekilde kullanması gereken ve zorluklarla karşı karşıya kaldığı bir yöntemdir. Ancak, mikro-dizilerde yapılan analiz sonucunda, önceden bilinen transkriptlerin anlatım düzeylerine ulaşma imkanı varken, RNA dizileme analizleri sonucunda; gen anlatım düzeyleri, kırılma bölgelerinin tespit edilmesi ve *novel* transkriptlerin tespit edilebilmektedir (56). Literatürde, 31 T-ALL hastası ve 18 hücre hattı toplamda 49 T-ALL örneği ile yapılan bir çalışmada ekzom ve transkriptom datası karşılaştırılarak, ekzomda tespit edilmeyip transkriptom datasında tespit edilebilen yeni driver mutasyonları göstermişlerdir (57).

Sonuç olarak bu çalışma ile;

- Farklı WNT aktivasyon yollarındaki genlerdeki gen anlatım düzeylerindeki farklılıklar tüm genom RNA dizilemesi ile belirlenmiştir,
- WNT aktivasyonu ile anlatımı değişen miRNA lar belirlenmiştir,
- Farklı gen kırılma ürünlerinin anlatım düzeyleri saptanmıştır,
- Farklı algoritmalar karşılaştırılmış ve lösemi örneklerinin analizi için RNA-Dizileme data analiz algortiması oluşturulmuştur.

KAYNAKLAR

1. H. Franklin Bunn JCA. *Kan Hastalıklarının Patofizyolojisi*. Lange; 2013.
2. Staal FJ, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**(1): 21-30.
3. Staal FJ, van Noort M, Strous GJ, Clevers HC. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep* 2002; **3**(1): 63-68.
4. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, ve ark. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996; **382**(6592): 638-642.
5. Clevers H vdWM. TCF/LEF factor earn their wings. *Trends Genet* 1997; **13**(12): 485-489.
6. Erbilgin Y, Ng OH, Mavi N, Ozbek U, Sayitoglu M. Genetic alterations in members of the Wnt pathway in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; **53**(3): 508-510.
7. Hatirnaz Ng O, Firtina S, Can I, Karakas Z, Agaoglu L, Dogru O, ve ark. A Possible Role for WNT5A Hypermethylation in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Turk J Haematol* 2015; **32**(2): 127-135.
8. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(1): 9-21.
9. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, ve ark. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2012; **481**(7380): 157-163.
10. Aifantis I, Raetz E, Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(5): 380-390.
11. Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. *Int Immunol* 2011; **23**(11): 661-668.
12. El Andaloussi A, Graves S, Meng F, Mandal M, Mashayekhi M, Aifantis I. Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus. *Nat Immunol* 2006; **7**(4): 418-426.
13. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016; **16**(8): 494-507.
14. Soulier J, Clappier E, Cayuela JM, Regnault A, Garcia-Peydro M, Dombret H, ve ark. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 2005; **106**(1): 274-286.
15. King B, Trimarchi T, Reavie L, Xu L, Mullenders J, Ntziachristos P, ve ark. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell* 2013; **153**(7): 1552-1566.
16. Garcia-Fernandez J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet* 2005; **6**(12): 881-892.
17. Roderick JE, Tesell J, Shultz LD, Brehm MA, Greiner DL, Harris MH, ve ark. c-Myc inhibition prevents leukemia initiation in mice and impairs the growth of relapsed and induction failure pediatric T-ALL cells. *Blood* 2014; **123**(7): 1040-1050.
18. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, ve ark. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2009; **114**(3): 647-650.

19. Karrman K, Kjeldsen E, Lassen C, Isaksson M, Davidsson J, Andersson A, ve ark. The t(X;7)(q22;q34) in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia results in overexpression of the insulin receptor substrate 4 gene through illegitimate recombination with the T-cell receptor beta locus. *Br J Haematol* 2009; **144**(4): 546-551.
20. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; **75**(5): 843-854.
21. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; **15**(6): 321-333.
22. Luan C, Yang Z, Chen B. The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *Onco Targets Ther* 2015; **8**: 2903-2914.
23. Staal FJ, Weerkamp F, Langerak AW, Hendriks RW, Clevers HC. Transcriptional control of T lymphocyte differentiation. *Stem Cells* 2001; **19**(3): 165-179.
24. Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(8): 581-593.
25. Endo Y, Wolf V, Muraiso K, Kamijo K, Soon L, Uren A, ve ark. Wnt-3a-dependent cell motility involves RhoA activation and is specifically regulated by dishevelled-2. *J Biol Chem* 2005; **280**(1): 777-786.
26. Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, ve ark. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 2003; **4**(5): 349-360.
27. Liang H, Coles AH, Zhu Z, Zayas J, Jurecic R, Kang J, ve ark. Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med* 2007; **204**(13): 3077-3084.
28. Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 2000; **16**(7): 279-283.
29. Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* 2003; **161**(4): 769-777.
30. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; **357**(6380): 695-697.
31. Ioannidis V, Beermann F, Clevers H, Held W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol* 2001; **2**(8): 691-697.
32. Yu Q, Sen JM. Beta-catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *J Immunol* 2007; **178**(8): 5028-5034.
33. Ranheim EA, Kwan HC, Reya T, Wang YK, Weissman IL, Francke U. Frizzled 9 knock-out mice have abnormal B-cell development. *Blood* 2005; **105**(6): 2487-2494.
34. Willinger T, Freeman T, Herbert M, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MF. Human naive CD8 T cells down-regulate expression of the WNT pathway transcription factors lymphoid enhancer binding factor 1 and transcription factor 7 (T cell factor-1) following antigen encounter in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006; **176**(3): 1439-1446.
35. Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, ve ark. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell* 2007; **12**(6): 528-541.

36. Illumina. *An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.
37. Fallows J. When Will Genomics Cure Cancer? *The Atlantic* 2013.
38. Livak KJ, ST. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods* 2001.
39. Weerkamp F, Baert MR, Naber BA, Koster EE, de Haas EF, Atkuri KR, ve ark. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(9): 3322-3326.
40. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2013; **24**(8): 921-927.
41. Wang J, Lu F, Ren Q, Sun H, Xu Z, Lan R, ve ark. Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties. *Cancer Res* 2011; **71**(23): 7238-7249.
42. Vercauteren SM, Starczynowski DT, Sung S, McNeil K, Salski C, Jensen CL, ve ark. T cells of patients with myelodysplastic syndrome are frequently derived from the malignant clone. *Br J Haematol* 2012; **156**(3): 409-412.
43. Janet Piñero NQ-R, Àlex Bravo, Jordi Deu-Pons, Anna Bauer-Mehren, Martin Baron, Ferran Sanz, Laura I. Furlong. DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database* 2015.
44. Janet Piñero ÀB, Núria Queralt-Rosinach, Alba Gutiérrez-Sacristán, Jordi Deu-Pons, Emilio Centeno, Javier García-García, Ferran Sanz, and Laura I. Furlong. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants. *Nucleic Acids Res* 2016.
45. Hebestreit K, Gröttrup S, Emden D, Veerkamp J, Ruckert C, Klein HU, Müller-Tidow C and Dugas M. Leukemia gene atlas--a public platform for integrative exploration of genome-wide molecular data. *PLoS One* 2012; **7**(6).
46. Noa Novershtern, Aravind Subramanian, Lee N. Lawton, Raymond H. Mak, W. Nicholas Haining, Marie E. McConkey, Naomi Habib, Nir Yosef, Cindy Y. Chang, Tal Shay ve ark. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell* 2011.
47. Torsten Haferlach, Alexander Kohlmann, Lothar Wiczorek, Giuseppe Basso, Geertruy Te Kronnie, Marie-Christine Béné, John De Vos, Jesus M. Hernández, Wolf-Karsten Hofmann, Ken I. Mills ve ark. Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Subclassification of Leukemia: Report From the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2010.
48. Xinzhou Deng, Zhenbo Tu1, Meng Xiong1, Kingsley Tembo, Lu Zhou, Pan Liu, Shan Pan, Jie Xiong, Xiangyong Yang, Jun Leng ve ark. Wnt5a and CCL25 promote adult T-cell acute lymphoblastic leukemia cell migration, invasion and metastasis. *Oncotarget* 2017; **8**(24): 39033-39047.
49. Shaorong Zhao, Wei Liu, Yinghui Li, Pengjiang Liu, Shufang Li, Daolei Dou, Yue Wang, Rongcun Yang, Rong Xiang, Feifei Liu. Alternative Splice Variants Modulates Dominant-Negative Function of Helios in T-Cell Leukemia. *PLoS ONE* 2016; **11**(9): e0163328.
50. Sophia Adamia1, Patrick M. Pilarski, Michal Bar-Natan, Richard M. Stone, James D. Griffin. Alternative Splicing in Chronic Myeloid Leukemia (CML): A Novel Therapeutic Target?. *Cur Cancer Drug Targets* 2013; **13**.

51. Shasha Li CH, Jianwei Li, Lei Liu, Wei Jing, Wei Tang, Weidong Tian, Jie Long. Effect of miR-26a-5p on the Wnt/Ca²⁺ Pathway and Osteogenic Differentiation of Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Calsif Tissue Int* 2016.
52. Shan X, Wen W, Zhu D, Yan T, Cheng W, Huang Z, ve ark. miR 1296-5p Inhibits the Migration and Invasion of Gastric Cancer Cells by Repressing ERBB2 Expression. *PLoS One* 2017; **12**(1): e0170298.
53. Jason A. Davis, Sita J. Saunders, Martin Mann, Rolf Backofen. Combinatorial ensemble miRNA target prediction of co-regulation networks with non-prediction data. *Nucleic Acids Res* 2017. doi: 10.1093/nar/gkx605.
54. Hans G. Drexler. The Leukemia-Lymphoma Cell Line, Facts Book. *Science Direct* 2000. ISBN: 978-0-12-221970-2.
55. Martin L. Tomov, Zachary T. Olmsted, Haluk Dogan, Eda Gungorurler, Maria Tsompana, Hasan H. Otu, Michael Buck, Eun-Ah Chang, Jose Cibelli, Janet L. Paluha. Distinct and Shared Determinants of Cardiomyocyte Contractility in Multi-Lineage Competent Ethnically Diverse Human iPSCs. *Sci Rep* 2016; **6**: 37637.
56. Ramsköld D KE, Sandberg R. How to analyze gene expression using RNA-sequencing data. *Methods Mol Biol* 2012; **802**.
57. Atak ZK, Gianfelici V, Hulselmans G, De Keersmaecker K, Devasia AG, Geerdens E, ve ark. Comprehensive analysis of transcriptome variation uncovers known and novel driver events in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS Genet* 2013; **9**(12): e1003997.

FORMLAR