



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MİYELOİD MALİGNİTELERDE, *TET2* VE *DNMT3A* GENLERİ İLE
hsa-miR-29 İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BESİME DENİZ BABACAN

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS-2022**

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MİYELOİD MALİGNİTELERDE, *TET2* VE *DNMT3A* GENLERİ İLE
hsa-miR-29 İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BESİME DENİZ BABACAN
ORCID ID: 0000-0002-2343-3285

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖZLEM İZCİ AY
ORCID ID: 0000-0002-4847-6943

TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

MERSİN
AĞUSTOS- 2022

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

31/08/2022

İmza/ Signature

Besime Deniz Babacan

ÖZET

MİYELOİD MALİGNİTELERDE, *TET2* ve *DNMT3A* GENLERİ İLE hsa-miR-29 İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hematolojik maligniteler, kemik iliğinde bulunan miyeloid veya lenfoid hücrelerin kontrolsüz ve aşırı çoğalmasına bağlı olarak gelişen hastalıktır. Son on yılda yapılan çalışmalarla hematolojik malignitelerin patobiyolojisi daha iyi anlaşılacakla birlikte prognostik faktörleri de belirlenmeye başlanmıştır. Özellikle genlerdeki ekzon ve onları çevreleyen intron bölgelerinin taranması ile yapılan hedeflenmiş dizi analizlerinin geliştirilmesiyle hastalık hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamız sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, Akut Miyeloid Lösemi (AML), Miyelodisplastik Sendrom (MDS), Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Esansiyel Trombositoz (ET) ve Polisitemi Vera (PV) hastalarında, DNA metilasyonunda önemli rol oynayan *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin ve hematopoetik farklılaşmalarda etkin rol oynayan miR29'ların ekspresyon düzeyleri, hastalardan alınan kemik iliği örneklerinde real-time kantitatif PCR yöntemi ile araştırıldı.

Çalışma grubumuza, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Bölümü Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran ve tanı alan, 28 AML, 34 MDS, 19 KML, 10 ET ve 11 PV olmak üzere toplam 102 hasta ve 13 kontrol grubu dâhil edildi. Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Saptanan ekspresyon düzeyleri; Toplam hasta (AML, MDS, KML, ET, PV)- kontrol, AML-kontrol, MDS-kontrol, KML-kontrol, ET-kontrol, PV-kontrol grupları arasında, SPSS-11.5 Windows veya Statistica 6.1 paket programlar kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Araştırma sonuçlarına göre *DNMT3A* ($p<0,001$), *TET2* ($p<0,001$), *miR-29a* ($p<0,001$), *miR-29b* ($p<0,001$) ve *miR-29c*'nin ($p<0,001$) ifade düzeylerindeki tüm gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*'nin ifadelerinin korelasyonları incelendiğinde; *DNMT3A* sırasıyla *miR-29a,b,c* ve *TET2* ile korele ($r=0,278$, $p=0,003$, $r=-0,072$, $p=0,446$, $r=0,176$, $p=0,059$, $r=0,097$, $p=0,303$) bulundu. *TET2* sırasıyla *miR-29a,b,c* ile korele ($r=0,378$, $p<0,001$, $r=-0,276$, $p=0,003$, $r=0,307$, $p=0,001$) bulundu. *miR-29a,b,c* kendi aralarında korele (*miR-29a,b* ($r=-0,346$, $p=0,000$), *miR-29a,c* ($r=0,274$, $p=0,003$) ve *miR-29b,c* ($r=-0,437$, $p=0,000$)) bulundu. Bunun sonucunda, elde ettiğimiz verilerin gelecekte bu alanda yapılacak çalışmalara ön veri sunabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Miyeloid malignite, *TET2*, *DNMT3A*, miRNA, Ekspresyon

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *TET2* AND *DNMT3A* GENES AND hsa-miR-29 EXPRESSION LEVELS IN MYELOID MALIGNANCIES

Hematological malignancies are a disease that develops due to uncontrolled and excessive proliferation of myeloid and lymphoid cells in the bone marrow. Although the pathobiology of hematological malignancies has been better understood with the studies conducted in the last decade, prognostic factors have begun to be determined. With the development of targeted sequence analysis, especially by scanning the exons in the genes and the intron regions surrounding them, we have provided more information about the disease.

In this thesis study, in patients with Acute Myeloid Leukemia (AML), Myelodysplastic Syndrome (MDS), Chronic Myeloid Leukemia (CML), Essential Thrombocythosis (ET) and Polycythemia Vera (PV) patients, the expression levels of *TET2* and *DNMT3A* genes, which play an important role in DNA methylation, and miR29s, which play an active role in hematopoietic differentiation, were investigated by real-time quantitative PCR method in bone marrow samples taken from patients.

To our working group, a total of 102 patients, 28 AML, 34 MDS, 19 CML, 10 ET and 11 PV, and 13 control groups, who applied and diagnosed to the Department of Hematology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Research and Application Hospital, Mersin University. Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from bone marrow samples taken from patients and healthy individuals. Detected expression levels; Total patients (AML, MDS, KML, ET, PV) - control, AML-control, MDS-control, KML-control, ET-control, PV control groups, statistically using package programs such as SPSS-11.5 Windows or Statistica 6.1. was evaluated.

According to the results of the study, when all groups in expression levels of *DNMT3A* ($p<0.001$), *TET2* ($p<0.001$), miR-29a ($p<0.001$), miR-29b ($p<0.001$) and miR-29c ($p<0.001$) were compared was found to be statistically significant. When the correlations of the expressions of *DNMT3A*, *TET2*, miR-29a, miR-29b and miR-29c were examined; *DNMT3A* was correlated with miR-29a,b,c and *TET2*, respectively ($r=0.278$, $p=0.003$, $r=-0.072$, $p=0.446$, $r=0.176$, $p=0.059$, $r=0.097$, $p=0.303$). *TET2* was correlated with miR-29a,b,c, respectively ($r=0.378$, $p<0.001$, $r=-0.276$, $p=0.003$, $r=0.307$, $p=0.001$). miR-29a,b,c correlated among themselves (miR-29a,b ($r=-0.346$, $p=0.000$), miR-29a,c ($r=0.274$, $p=0.003$) and miR-29b,c ($r=-0.437$, $p=0.000$)) were found. As a result, we think that the data we have obtained can provide preliminary data for future studies in this field.

Keywords: Myeloid malignancy, *TET2*, *DNMT3A*, miRNA, Expression

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, tüm bilgi birikimi ile ihtiyaç duyduğum her an destek olan, sabır ve inanca yol gösteren, tezimin hazırlanma sürecinde ve öncesinde göstermiş olduğu bilimsel katkıları için danışman hocam Prof. Dr. Özlem İZCİ AY'a,

Bilimsel ve akademik katkılarından dolayı Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a, Prof, Dr. İ. Ömer BARLAS'a, Doç. Dr. M. Ertan AY'a, Tezimin deneysel sürecinde verdiği destek için değerli Dr. Kenan ÇEVİK'e,

Miyeloid malignite tanısı almış bireylerden kemik iliği örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmamıza destek veren Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Anıl TOMBAK ve hematoloji kliniği çalışanlarına,

İstatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Didem DERİCİ YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her zaman destekçim olan canım aileme teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2020-1-TP2-4003

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	ii
ONAY	iii
ETİK BEYAN	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiii
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Hematopoez	3
2.2. Hematopoetik Kök Hücre Nişi ve Yaşlanması	6
2.3. Kanserde Hematopoetik Kök Hücre Nişi	6
2.4. Hematopoetik Kök Hücrede Hücre Döngüsü Özelliklerine Genel Bakış	9
2.5. Klonal Hematopoez	10
2.6. Hematolojik Maligniteler	10
2.6.1. Miyeloid Malignite	12
2.6.1.1. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	12
2.6.1.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	18
2.6.1.3. Miyelodisplastik Sendromlar (MDS)	22
2.6.1.4. Miyeloproliferatif Neoplazmalar (MPN)	28
2.6.1.4.1. Polisitemiya Vera (PV)	29
2.6.1.4.2. Esansiyel Trombositemi (ET)	30
2.7. Epigenetik ve Lösemi	32
2.8. DNA Metiltransferazlar	32
2.8.1. DNA Metiltransferaz-3A (DNMT3A) ve Yapısı	33
2.8.2. Ten-Eleven Translokasyon (TET) Ailesi	36
2.8.2.1. TET2 Geni	37
2.8.3. MikroRNA (miRNA)	41
2.8.3.1. Miyeloid Malignitede miR-29 Ailesi	45
3. MATERYAL ve METOD	48
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları	48
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	48
3.3. Kontrol ve Hasta Grubunun Seçimi	49
3.4. Kemik İliğinden RNA İzolasyonu	50
3.5. cDNA Sentezi	51
3.5.1. DNMT3A ve TET2 Geninde cDNA Sentezi	51
3.5.2. miR-29 cDNA Sentezi	52
3.6. Real-Time Kantitatif PCR İle Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	53
3.7. Gen İfade Analizi	55
3.8. İstatistiksel Analiz	56

4. BULGULAR	57
4.1. Çalışma gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi	57
4.2. Genlerinin İfade Değişimlerinin Değerlendirilmesi	58
4.2.1. <i>DNMT3A</i> İfade Seviyesindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi	61
4.2.2. <i>TET2</i> İfade Seviyesindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi	64
4.2.3. <i>miR-29a</i> İfade Seviyesindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi	65
4.2.4. <i>miR-29b</i> İfade Seviyesindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi	66
4.2.5. <i>miR-29c</i> İfade Seviyesindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi	68
4.3. Genlerin İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	69
4.3.1. ET Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	70
4.3.2. AML Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	72
4.3.3. KML Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	75
4.3.4. MDS Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	77
4.3.5. PV Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	78
4.3.6. Kontrol Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu	79
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	82
KAYNAKLAR	88
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1: AML’li yetişkinlerin %55’inin lösemik blastlarında bulunan sitogenetik anormallikler.	13
Tablo 2.2: AML’li yetişkinlerin %55’inin lösemik blastlarında bulunan diğer sitogenetik anormallikler.	15
Tablo 2.3: AML’de meydana gelen en yaygın epigenetik mutasyonların özeti.	17
Tablo 2.4: Major driver genler.	25
Tablo 3.1: cDNA sentezinde kullanılan bileşikler.	52
Tablo 3.2: Real-Time PCR reaksiyonu çalışma koşulları.	52
Tablo 3.3: miR-29 cDNA reaksiyonu için kullanılan karışımlar 1	53
Tablo 3.4: miR-29 cDNA reaksiyonu için kullanılan karışımlar 2	53
Tablo 3.5: <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> ve <i>ACTB</i> genlerinin primer/prob dizileri.	54
Tablo 3.6: miR-29 ve miR-26 primer ve prob dizileri.	54
Tablo 3.7: Real-Time PCR için gerekli bileşenler	55
Tablo 4.1: Gruplara göre cinsiyet dağılımı.	57
Tablo 4.2: Gruplara göre yaş dağılımı.	57
Tablo 4.3: Genlerin gruplara göre ekspresyon dağılımları.	62
Tablo 4.4: <i>DNMT3A</i> gen ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.	63
Tablo 4.5: <i>TET2</i> gen ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.	64
Tablo 4.6: miR-29a’nın ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.	66
Tablo 4.7: miR-29b’nin ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.	67
Tablo 4.8: miR-29c’nin ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.	69
Tablo 4.9: Hasta ve kontrol grupları arasında <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>miR-29a</i> , <i>miR-29b</i> ve <i>miR-29c</i> ’nin korelasyon tablosu.	70
Tablo 4.10: ET Grubunun Korelasyonu Tablosu.	71

Tablo 4.11: AML Grubunun Korelasyonu Tablosu.	73
Tablo 4.12: KML Grubunun Korelasyonu Tablosu.	75
Tablo 4.13: MDS Grubunun Korelasyonu Tablosu.	77
Tablo 4.14: PV Grubunun Korelasyonu Tablosu.	79



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Hematopoetik kök hücreye bağlı hematopoetik soylar.	4
Şekil 2.2: HKH farklılaşması için revize edilmiş modellere örnek.	5
Şekil 2.3: Homeostada yetişkin kemik iliği HKH nişi.	7
Şekil 2.4: Yaşlanma ve malignitede yetişkin kemik iliği HKH nişi.	8
Şekil 2.5: Hücre döngüsü düzenlenmesindeki moleküler mekanizma.	9
Şekil 2.6: Hematolojik neoplazmaların kavramsal sınıflandırması.	11
Şekil 2.7: Yetişkin ve çocukluk çağı AML’inde daha sık görülen Sitogenetik anormalliklerin sıklığı.	16
Şekil 2.8: KML LKH’lerinde olası sinyal yolları.	21
Şekil 2.9: KML’de otofaji.	21
Şekil 2.10: MDS ve diğer miyeloid neoplazmalarda yaygın driver değişiklikleri.	26
Şekil 2.11: MDS ve Saml/pAML arasındaki mutasyonların sıklığı.	27
Şekil 2.12: DNA metiltransferazlar.	33
Şekil 2.13: DNA metiltransferaz proteinlerinin yapısı ve bağlayıcı ortakları.	34
Şekil 2.14: Miyeloid ve lenfoid lösemide <i>DNMT3A</i> mutasyon sıklığının dağılımı.	36
Şekil 2.15: TET enzimi.	37
Şekil 2.16: TET proteinlerinin etki alanı yapısı.	38
Şekil 2.17: Çeşitli hematolojik malignitelerde <i>TET2</i> mutasyonun sıklığı.	40

Şekil 2.18: Arka plan mutasyonları olarak <i>TET2</i> mutasyonları.	41
Şekil 2.19: miRNA biyogenez faktörlerinin alan bileşimi.	42
Şekil 2.20: Kanonik miRNA'nın biyogenez yolu.	43
Şekil 2.21: miRNA homeostazının nicel özellikleri.	44
Şekil 2.22: Kromozom 1 ve 7 üzerindeki transkripsiyon faktörleri ile miR-29 kümelerinin düzenlenmesi.	46
Şekil 3.1: İş akış şeması.	50
Şekil 4. 1: KML örneğinde <i>DNMT3A</i> gen ifadesinin görüntüsü.	58
Şekil 4. 2: MDS örneğinde <i>TET2</i> gen ifadesinin görüntüsü.	59
Şekil 4. 3: ET örneğinde miR-29a ifadesinin görüntüsü.	59
Şekil 4. 4: AML örneğinde miR-29b ifadesinin görüntüsü.	60
Şekil 4. 5: PV örneğinde miR-29c ifadesinin görüntüsü.	60
Şekil 4. 6: <i>DNMT3A</i> geni ifade değerleri.	63
Şekil 4. 7: <i>TET2</i> geni ifade değerleri.	65
Şekil 4. 8: <i>miR-29a</i> geni ifade değerleri.	66
Şekil 4. 9: <i>miR-29b</i> geni ifade değerleri.	68
Şekil 4. 10: <i>miR-29c</i> geni ifade değerleri.	69
Şekil 4. 11: ET Korelasyon Saçılım Grafikleri	72
Şekil 4. 12: AML Korelasyon Saçılım Grafikleri	74
Şekil 4. 13: KML Korelasyon Saçılım Grafikleri	76
Şekil 4. 14: MDS Korelasyon Saçılım Grafikleri	78
Şekil 4. 15: PV Korelasyon Saçılım Grafikleri	80
Şekil 4. 16: Kontrol Korelasyon Saçılım Grafikleri	81

KISALTMALAR ve SİMGELER

HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HM	: Hematolojik Malignite
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
MPN	: Miyeloproliferatif Neoplazm
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
PV	: Polisitemiya Vera
ET	: Esansiyel Trombositemi
PMF	: Primer Miyelofibroz
KMML	: Kronik Miyelomonositik Lösemi
Ph (-)	: Philadelphia Negatif
<i>ABL 1</i>	: ABL Proto- Oncogene 1/ Non-Receptor Tyrosine Kinase 1
<i>BCR</i>	: BCR Activator of RhoGEF and GTPase
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
RT-PCR	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
cDNA	: Complementary DNA
5-mC	: 5-Metil Sitozin
5-hmC	: 5-Hidroksimetil Sitozin
miRNA	: MikroRNA
mRNA	: Mesajcı RNA
<i>DNMT3A</i>	: DNA Metiltransferaz 3 Alfa
<i>TET2</i>	: Ten-Eleven Translocation 2
KKH	: Kırmızı Kan Hücresi
BKH	: Beyaz Kan Hücresi
MPP	: Multipotent Progenitör Hücre
CMP	: Common Miyeloid Progenitör

MLP	: Multilenfoid Progenitörler
GMP	: Granülosit Makrofaj Progenitörler
MEP	: Megakaryosit Eritroid Progenitörler
HKPH	: Hematopoetik Kök ve Progenitör Hücre
CLP	: Common Lymphoid Progenitör
MKRP	: Megakaryosit Progenitörler
MERP	: Megaeritrosit Progenitörler
CMRP	: Common Miyeloid Progenitörler
EV	: Ekstrasellüler Vezikül
MKH	: Mezankimal Kök Hücre
RAR γ	: Retinoik Asit Reseptörü Gama
<i>RB1</i>	: RB- Transcriptional Corepressor 1
<i>MIB1</i>	: MIB E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
LKH	: Lösemi Kök Hücresi
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
CKI	: CDK İnhibitörleri
<i>TP53</i>	: Tumor Protein 53
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
HL	: Hodgkin Lenfoma
MM	: Multiple Miyelom
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
ML	: Miyeloid Lösemi
CD80	: Cluster of Differentiation 80
CD86	: Cluster of Differentiation 86
IL	: İnterlökin
IFN α	: İnterförin Alfa
<i>IDH1/2</i>	: İsocitrate Dehydrogenase 1/ 2
<i>FLT3</i>	: Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3
<i>NPM1</i>	: Nucleophosmin 1
<i>NRAS</i>	: NRAS Proto-Oncogene, GTPase

<i>ASXL1</i>	: ASXL Transcriptional Regulator 1
ncRNA	: Non-coding RNA
TK	: Tirozin Kinaz
<i>CRKL</i>	: CRK Like Proto-Oncogene, Adaptor Protein
<i>RUNX1</i>	: RUNX Family Transcription Factor 1
<i>IKZF1</i>	: IKAROS Family Zinc Finger 1
<i>WT1</i>	: WT1 Transcription Factor
<i>CBL</i>	: CBL Proto-Oncogene
<i>GNAS</i>	: GNAS Complex Locus
<i>PPM1D</i>	: Protein Phosphatase, Mg ²⁺ / Mn ²⁺ Dependent 1 D
<i>BCORL1</i>	: BCL6 Corepressor Like 1
<i>SF3B1</i>	: Splicing Factor 3b Subunit 1
<i>JAK2</i>	: Janus Kinase 2
ATP	: Adenozin Trifosfat
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörleri
WNT	: Wingless Related İntegration Site
JAK-STAT	: Janus Kinaz-Sinyal Transduseri Transkripsiyon Aktivatörü
PKMH	: Periferik Kan Mononükleer Hücre
sAML	: Sekonder AML
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
<i>CEBPA</i>	: CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
Hb	: Hemoglobin
PTM	: Post Transkripsiyonel Modifikasyon
<i>KRAS</i>	: KRAS Proto-Oncogene, GTPa

1.GİRİŞ

Hematopoez, memeli kan hücrelerinin yaşam boyu rejenerasyonunu sürdürebilmek için hem kendini yenileme hem de hematopoetik kök hücrelerin (HKH) iyi düzenlenmiş farklılaşma sürecini gerektiren oldukça dinamik bir gelişim sürecidir [1]. Hematopoez, insan sağlığı için çok önemlidir. Kan ve bağışıklık sistemleri vücuda oksijen ve besin sağlamaktan, yara iyileşmesini desteklemekten ve patojenlerle savaşmaktan sorumludur. Bu işlevler, hematopoetik sistemi oluşturan çeşitli hücre tipleri tarafından gerçekleştirilir. Bunlar, kırmızı kan hücreleri (alyuvar), trombositler, doğuştan gelen bağışıklık hücreleri (nötrofiller, monositler, vb.) ve adaptif bağışıklık hücreleridir (T hücreleri ve B hücreleri) [2].

Tüm kan hücresi tipleri, yetişkin hematopoezinin önemli bir bölgesi olan kemik iliğinde bulunan HKH'den kaynaklanır [3]. Memeli yetişkinlerde, HKH'ler nispeten hareketsiz bir durumda bulunurlar, hem kendini yenileme hem de çok potansiyelli yeteneklerini korurken, kemik iliğinde ömür boyu bakımlarını sağlarlar. Kendi kendini yenileme ve farklılaşma, yaşam boyunca hematopoetik sistem homeostazını sürdürebilmek için önemlidir. Dışsal ve içsel faktörlerin (niş ilişkili faktörler, sinyal iletim yolları, transkripsiyon faktörleri ve kromatin değiştiriciler dahil) bir kombinasyonu sonucu, HKH'ler kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli arasında dinamik denge sağlanmış olur. Bu süreçlerin bozulması ve yanlış düzenlenmesi, yaşamı tehdit eden hematolojik bozukluklara yol açma potansiyeline sahiptir [1,2].

Hematolojik maligniteler (HM'ler), kan hücresi gelişiminin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir ve kan hücrelerinin üretimini ve işlevini etkileyerek enfeksiyonlarla savaşamama veya kontrolsüz kanamaya yatkınlık gibi sonuçlar doğurabilir. Kemik iliğindeki HKH'ler, miyeloid veya lenfoid soyların, olgunlaşmamış progenitör hücrelerinin çoğalmasına neden olur. Miyeloid soyun hücreleri; eritrositler, trombositler, nötrofiller, eozinofiller, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi immün yanıtın beyaz kan hücrelerini içerirken, lenfoid soy hücreleri ise; adaptif immün yanıtta yer alan B ve T lenfositleri içerir. Normal hematopoetik farklılaşmanın bozulması klinikte, lösemi, lenfoma ve miyelom olmak üzere üç ana tip kan kanseri ile sonuçlanabilir. Lösemiye, kemik iliğinde aşırı miktarda anormal beyaz kan hücresi üretimi neden olur ve bu da kanda lösemik hücrelerin dolaşımına neden olur. Lösemi, neoplastik hücrelerin, soyuna ve klinik seyrine bağlı olarak kategorize edilir [1].

Miyelodisplastik Sendromlar (MDS) ve Akut Miyeloid Lösemi (AML), kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerle yakından ilişkili olan bozukluklardır. AML, miyeloblastların farklılaşması ve hiperproliferasyonu ile karakterize edilirken, MDS, kemik iliği kök hücrelerinin displazisi ile birlikte miyeloblastın bir miktar dediferansiyasyonu olması ve hiperproliferasyonu ile karakterize edilir. AML, *de novo* veya önceden var olan MDS veya Miyeloproliferatif Neoplazmalardan (MPN) gelişebilir. Kronik MPN'ler ise, olgun periferik kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterize edilir. MPN'lerden biri olan Kronik Miyeloid Lösemi (KML), kromozom 9 üzerindeki *ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (ABL1)* geninin, kromozom 22 üzerindeki *BCR activator of RhoGEF and GTPase (BCR)* genine translokasyonu ile karakterize edilir. Böylece Philadelphia kromozomu ve onkojenik BCR-ABL füzyon proteini oluşturulur. Philadelphia kromozomu negatif (Ph-neg) MPN'ler, Esansiyel Trombositemi (ET), Polisitemiya Vera (PV) ve Primer Miyelofibroz (PMF) olmak üzere üç temel bozukluğu oluşturur [4].

Moleküler biyolojik çalışmalar, hematolojik malignitelerin mekanizmasını aydınlatmak ve patolojisine ışık tutmak için önemli bir yere sahiptir [5]. Malignitelerin sınıflandırılmasında ve prognostik faktörlerinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Akut lösemilerin patogenezi ve hücre

biyolojisini anlamak için en yaygın olarak klasik karyotipleme, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) veya Real-time PCR (RT-PCR) gibi moleküler teknikler kullanılabilmektedir [6]. Sitogenetik testin, miyeloid malignitelerde risk sınıflandırmasının temel taşı olduğu söylenmektedir [7]. Çeşitli çalışmalar, sitogenetik değişikliklerin (kromozomal translokasyonlar ve genetik materyal kaybı veya kazancı gibi) moleküler belirteçlerle karşılaştırıldığında hastalığın prognozunu doğru belirleyebileceğini göstermektedir. Son on yılda dizileme ve gen ifade metodolojilerindeki gelişmeler, farklı genetik anormalliklerin karmaşık kombinasyon modellerini gösteren hastalık heterojenliğini ortaya çıkarmıştır. cDNA mikrodizileri gibi gen ifadesinin değerlendirilmesi için yeni tekniklerin geliştirilmesi ile hem hematolojik malignitelerde hem de solid tümörlerde kanserin teşhisi, sınıflandırılması ve prognozunda büyük ilerlemeler sağlanmıştır [6].

Son yıllarda, moleküler biyoloji teknikleri sayesinde farklı epigenetik değiştiricilerdeki mutasyonlar da tespit edilmiştir. Bu epigenetik değiştiricilerin değişen fonksiyonları, gen aktivasyonu ve gen baskılanması arasındaki fizyolojik dengeyi bozar ve anormal gen ifade düzenlemesine katkıda bulunur [6]. Bir dizi sekanslama çalışmaları ile miyeloid malignitelerde *DNA Metiltransferaz 3 Alfa (DNMT3A)* ve *Ten-Eleven Translocation 2 (TET2)* genlerinin epigenetik modifikasyonlarla sıklıkla mutasyonlardan etkilendiği gözlenmiştir [7,8]. DNMT3A, hedef DNA'da DNA metilasyonunu katalize eden *de novo* metiltransferazlardır. TET2, 5-metil sitozinin (5-mC) 5-hidroksimetil sitozine (5-hmC) dönüşümünü katalize ederek DNA demetilasyonunda merkezi bir rol oynayan bir enzimdir [8]. DNMT3A ve TET2 genlerinde meydana gelen mutasyonların, kemik iliğinde anormal HKH birikmesine neden olduğu ve böylece hastalık riskini artırdığı söylenmektedir [6].

Yapılan moleküler çalışmalar mikroRNA'ların (miRNA'lar) Akut Miyeloid Lösemi (AML), Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve Miyeloproliferatif Neoplazmalar (MPN) dahil miyeloid malignitelerde önemli role sahip olduğunu öne sürmektedir [9]. miRNA'lar, gen ifade modellerini ve hücresel mRNA'yı hedefleyen, gen ifadesinin önemli epigenetik düzenleyicileri olarak görev yapan, kısa kodlanmayan RNA'lardır. Genomun protein kodlayan genlerin intronlarında veya ekzonları içinde kodlanırlar ve diğer epigenetik düzenleyicileri düzenleyen posttranskripsiyonel gen susturma ve protein kodlama genlerinin ifadesini modüle ederler [6]. miRNA'lar, hücre döngüsü, tümör büyümesi ve apoptozda yer alan çoklu yollara müdahale eden tümör baskılayıcı veya onkogen olarak hareket edebilir. Ayrıca farklı lösemik alt tiplerin farklı miRNA ifade profillerine sahip olduğu da düşünülmektedir [9].

Bu tez çalışmasında, miyeloid malignitesi olan bireylere ait koleksiyon kemik iliği örneklerinden *TET2*, *DNMT3A* genleri ve bu genleri hedefleyen ortak miR'lerin (miR29a-3p, 29b-3p ve 29c-3p) ifade düzeyindeki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Klinik anlamda bu değişimin miyeloid malignitelerde birer biyobelirteç olup olamayacağına dair literatüre katkı sunmak amaçlanmıştır. Aynı zamanda, her iki geni de en yüksek skorla (> 97) hedefleyerek post translasyonel kontrollerini sağlayan miR'lerin ifade düzeylerinin etkisi de araştırılmak istenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

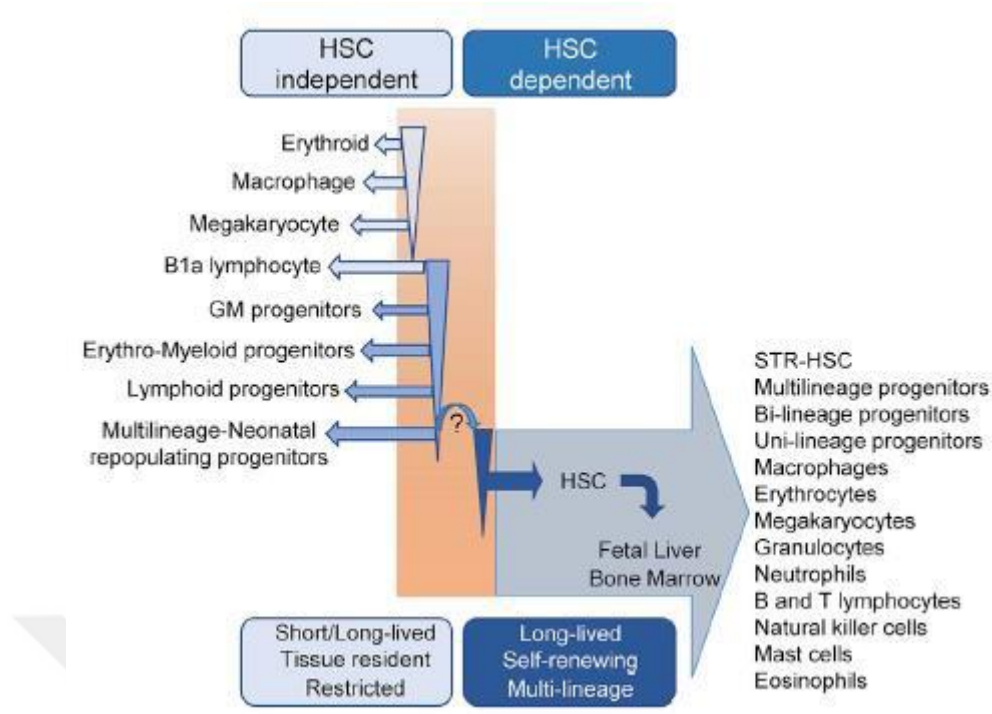
2.1. Hematopoez

İnsan kanı, belirli işlevlere sahip birkaç farklı hücre tipi içermektedir. Kırmızı kan hücreleri (KKH'ler) olarak da bilinen eritrositler, akciğerlerden dokulara oksijen taşır ve karbondioksiti uzaklaştırır. Beyaz kan hücreleri (BKH'ler) olarak da bilinen lökositler, inflamatuvar reaksiyon ve bağışıklık tepkisinde rol oynar. BKH'leri granülositleri (nötrofiller, bazofiller, eozinofiller ve mast hücreleri), lenfositleri (T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri), monositleri/makrofajları ve dendritik hücreleri içerir. Trombositler megakaryositlerden türetilen hücrelerdir ve homeostazın sürdürülmesinde önemli bir rol oynarlar [10].

Hematopoetik sistem insan sağlığı için gereklidir ve eritrositler, megakaryositler, adaptif bağışıklık hücreleri (B lenfositleri ve T lenfositleri), nötrofiller ve monositler dahil olmak üzere çok sayıda özel hücre tipinden oluşur. Bazı hematopoetik hücre tipleri uzun ömürlü olsa da (örneğin T hücreleri), bazıları kısa ömürlüdür (nötrofiller ve trombositler gibi). Bu çeşitli kan soyları, hematopoez olarak bilinen bir süreç olan kan sisteminin homeostazını sürdürmek için sürekli olarak yenilenmektedir ve yaşam boyunca hematopoez, hematopoetik kök hücreler (HKH'ler) tarafından korunmaktadır [11].

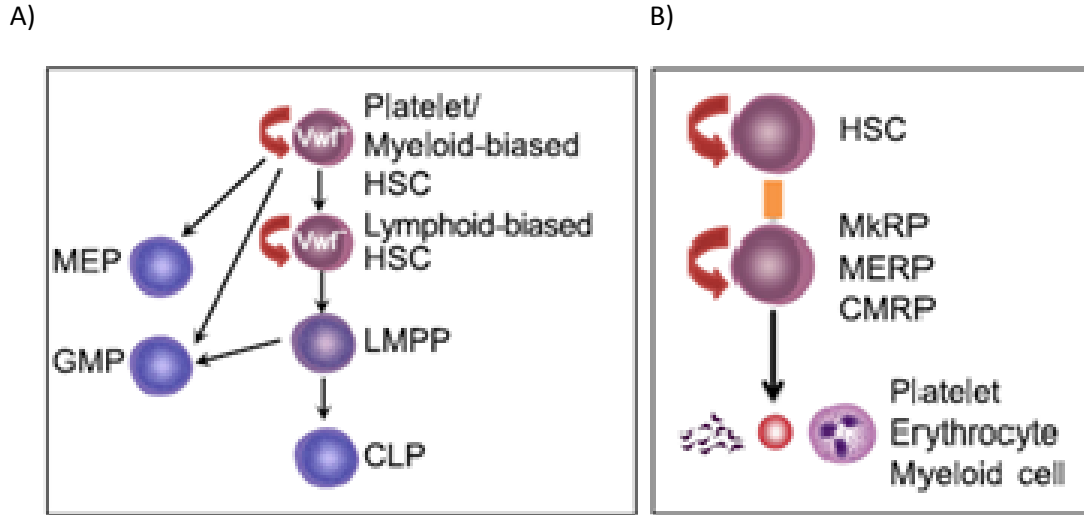
Hematopoetik kök hücreler (HKH'ler), kendi kendini yenileme ve çoklu soylara farklılaşma yetenekleri sayesinde tüm kan hücrelerinin yaşam boyu üretimini sürdürür [10]. Hematopoezi koruyan HKH'ler, sürekli hematopoez talebini karşılamak için, olgun kan hücresi üretimini HKH havuzuna karşı dengelemelidir. Çoğu HKH, hareketsiz bir durumda bulunur ve yalnızca ara sıra hücre döngüsüne girer. Bu, HKH'leri tükenme ve hücre döngüsüyle ilişkili mutasyon hasarından koruduğunu düşündüren bir özelliktir [12].

Klasik hematopoez modelinde, HKH'ler, sonunda olgun hematopoetik hücrelere doğru farklılaşan bir dizi multipotent, oligopotent ve unipotent progenitörden oluşur. HKH'lerin soyu olan multipotent progenitör hücreler (MPP'ler), tam bir soy potansiyeline sahiptir ancak kendini yenileme yetenekleri sınırlıdır. MPP'ler oligopotent progenitörlere yani; ortak miyeloid progenitörler (CMP'ler) ve multilenfoid progenitörlere (MLP'ler) yol açarlar. CMP'ler granülosit/makrofaj progenitörleri (GMP'ler) ve megakaryosit/eritroid progenitörleri (MEP'ler) olarak farklılaşır ve bunlar daha sonra tek soylu progenitörlere ve olgun öncülere yol açarlar. MLP'ler hem GMP'leri hem de B, T ve NK hücre öncüllerine farklılaşan ortak lenfoid progenitörleri üretebilirler. Şekil 2.1, bu mevcut hematopoez modelini özetlemektedir [10,13].



Şekil 2.1: HKH'ye Bağlı Hematopoetik Soylar [13].

Klasik model, HKH'lerin farklılaşma sürecini anlamada kolaylık sağlamaktadır. Fakat bu modelin, hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin (HKPH'ler) karmaşıklığını basitleştirmesi bakımından bazı eksiklikleri olduğu ve yalnızca yüzey belirteçlerine ve toplu hücreler kullanılarak transplantasyona dayandığı belirtilmektedir. Şekil 2.2, hematopoetik kök hücre farklılaşmasındaki yeni modellere örnektir. Sieburg ve Eaves grubundaki araştırmacılar, miyeloid-lenfoid hücreler oranına dayalı olarak miyeloid-önyargılı (My-Bi), dengeli (Ba) ve lenfoid-önyargılı (Ly-Bi) HKH'leri tanımlamışlardır. Trombosit yanlı HKH'ler, hematopoetik hiyerarşinin üstünde bulunan bir My-Bi alt kümesi olarak da rapor edilmiştir (Şekil 2A). Araştırmacılar, uzun süredir uzun vadeli (LT)-HKH'ler (LT-HKH'ler) ve kısa vadeli (ST)-HKH'ler (ST-HKH'ler) kavramını benimsemişlerdir. Ayrıca Lu ve grubu HKH popülasyonundaki heterojenliği de ortaya çıkarmışlardır ve HKH'lerin soylara eşit şekilde katkıda bulunmadığını göstermişlerdir. Bir farklılaşma modeli, GMP'ler, MEP'ler ve CLP'ler dahil olmak üzere progenitör hücre popülasyonlarından oluşmaktadır; diğer grup olgun lenfoid kan hücrelerinden oluşmaktadır. Benzer şekilde, tek hücre nakli ile Yamamoto ve grubu, megakaryosit çoğaltan progenitörleri (MKRP'ler), megakaryosit-eritrosit çoğaltan progenitörleri (MERP'ler) ve ortak miyeloid çoğaltan progenitörleri (CMRP'ler) içeren fenotipik olarak tanımlanmış HKH'de kendi kendini yenileyen soy kısıtlı progenitörlerin bulunduğunu gözlemlemiştir (Şekil 2B) [14].



Şekil 2.2: Hematopoietik kök hücre farklılaşması için revize edilmiş modellere örnek. (A) vWF+ trombosit yanlı HKH'ler hiyerarşinin zirvesinde yer alır ve tüm progenitörlere ve olgun hücelere farklılaşabilir. (B) Miyeloid baypas modeli [14].

Ekstrasellüler veziküller (EV'ler), hücreler arası iletişimde önemli rollere sahiptir ve kanser bağlamında, EV'ler, hedef hücrelerde gen ifadesini etkileyerek stroma özelliklerini ve tümör anjiyogenezini değiştirir, dolayısıyla kanser ilerlemesini ve metastazını arttırmaktadır. EV'ler, kemik iliği mikro ortamını modüle ederek HKH'lerin ve progenitör hücrelerin kaderinin belirlenmesinde de rol oynamaktadır. Ayrıca, biyomoleküllerin EV'ler yoluyla iletimi, hematolojik malignitelerin gelişimi ve ilerlemesi sırasında patojenik süreçlere katkıda bulunmaktadır. Normal hematopoez, EV'lerde bulunan biyomoleküllerden etkilenir. Örneğin, araştırmacılar, mezenkimal stromal hücrelerden kaynaklanan EV'lerin, miyeloid önyargılı hematopoietik progenitör hücrelerin genişlemesini arttırdığını göstermişlerdir. Bu spekülasyonu, bu hücrelerden türetilen EV'lerin hematopoietik kök ve progenitör hücrelerde (HKPH'ler) miyeloid progenitörlerin genişlemesini arttırdığı murin stromal hücrelerinde yapılan bir deneyle göstermişlerdir. Megakaryositik mikropartiküllerin, HKPH'lerin olgun megakaryositlere farklılaşmasını uyardığı da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Eksozomlardan farklı olarak bu mikropartiküller, mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) gibi diğer hücreler üzerinde önemli etkiler olmaksızın spesifik olarak HKPH'leri hedeflemektedir. Özellikle megakaryositik hücreleri genişletirler. Bu mikropartiküller, içeriklerini endositoz yoluyla ve ayrıca HKPH membranı ile doğrudan füzyon yoluyla iletmektedir. HKPH'ler bu mikro partikülleri makropinositoz ve lipid salıncı yollarla almaktadır. Bu iki hücre türü arasındaki bu tür etkileşimlere, mikropartiküllerin HKPH'lerin yüzeyinde CD54 (ICAM-1), CD11b, CD18 ve CD43 gibi farklı moleküllerle bağlanması aracılık etmektedir. Ek olarak, EV'ler, kemik iliği MKH'lerinin HKH üzerindeki etkisine de aracılık etmektedirler [15].

Yaşam boyunca hematopoietik homeostazı sağlamak için, farklılaşma ve kendini yenileme arasındaki dengenin sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Aşırı farklılaşma veya yetersiz kendini yenileme HKH havuzunu tüketirken, yetersiz farklılaşma veya kontrolsüz kendini yenileme miyeloproliferatif hastalıklara veya lösemiye yol açabilmektedir. HKH aktivitesi, transkripsiyonel ve epigenetik düzenleyiciler, metabolik yollar ve nöral sinyaller veya 'kök hücre nişi' olarak adlandırılan kemik iliği mikro ortamı gibi hücreye özgü faktörlerin karmaşık etkileşimi tarafından düzenlenmektedir. Yetişkinlerde, HKH'ler öncelikle kemik iliğinde bulunmaktadır ve kendilerini yenileme ve olgun kan hücrelerine çoğalan ve farklılaşan çeşitli progenitörler üretme yetenekleriyle karakterize edilmektedirler [16].

2.2. Hematopoetik Kök Hücre Nişi ve Yaşlanması

HKH'lerin ve niş düzenleyicilerin nasıl etkileşime girdiğini anlamak, yetişkin kemik iliğinin mikroanatomik organizasyonu ve özellikleri hakkında bilgi gerektirir. Kemik iliği, uzun kemiklerin ve eksenel kemiklerin boşlukları içinde vasküler ve innerve edilmiş bir ağ ile birbirine bağlanan çeşitli hematopoetik ve hematopoetik olmayan hücre tiplerini kapsayan karmaşık bir organdır. Çeşitli kemik iliği stromal hücreleri ve diğer hücre tipleri, MKH'ler, adipositler ve glial hücreler dahil olmak üzere HKH aktivitesinin düzenlenmesinde yer almaktadır.

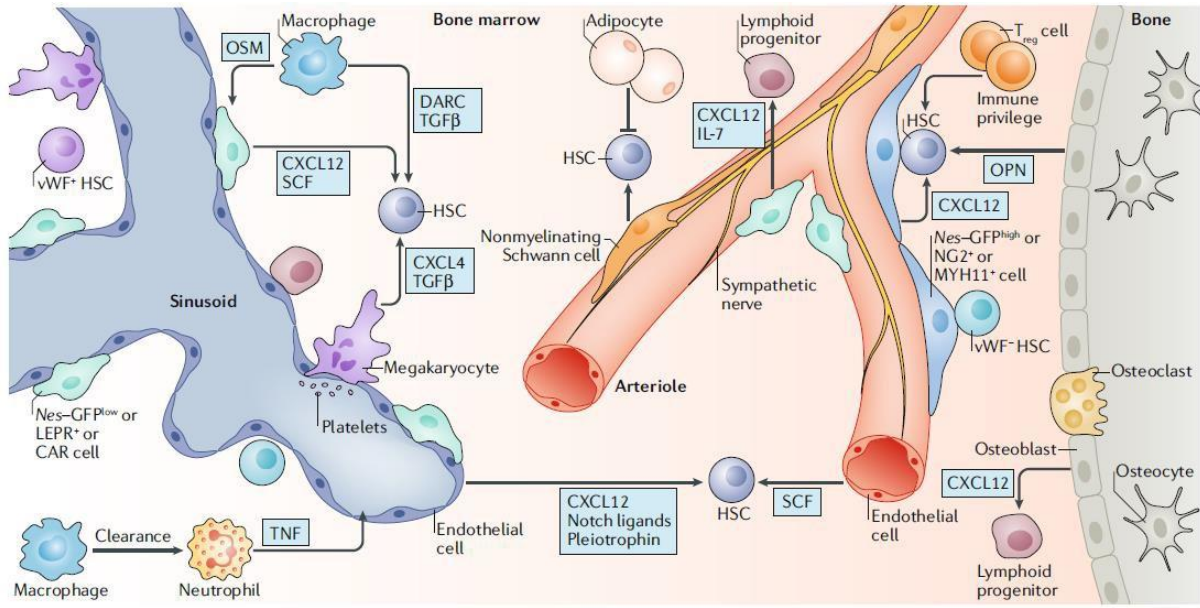
Bir "kök hücre nişi", kök hücrelerin farklılaşmamış ve kendi kendini yenileyebilen bir durumda tutulduğu ve kaderlerini belirleyen uyarınlara aldığı bir doku içindeki yerel mikro ortamı ifade eder. Hematopoetik sistemde niş, HKH sayıları, çoğalma, lokalizasyon, *in vivo* çoğalma kapasitesi üzerindeki etkileri belirlenerek değerlendirilir. Kök hücre nişleri, farklı metodolojiler kullanarak *in vivo* tanımlamalarını mümkün kılan, niş ve kök hücreler arasındaki fiziksel ilişki veya kök hücre bakımı için gerekli faktörlerin seçimi gibi birkaç temel özelliği paylaşır.

Memeli yaşlanması, dejeneratif hastalıklar ve birçok kanser türünün artan insidansı ile ilişkili ilerleyici doku yıpranması ile karakterize edilir. Hematopoetik sistemde, HKH işlevindeki düşüşe atfedilen bağışıklık tepkilerinde yaşa bağlı değişiklikler, enfeksiyonlara, otoimmüniteye, anemiye ve miyeloproliferatif hastalıklara duyarlılığın artmasına katkıda bulunmaktadır. Farelerde yaşla birlikte fenotipik olarak tanımlanmış HKH'lerin mutlak sayısı artmasına rağmen, yaşlı HKH'lerin rejeneratif potansiyeli azalır. Hücre polaritesindeki kusurlar, değişmiş transkripsiyonel ve epigenetik faktörler, değişmiş metabolizma ve DNA hasarı dahil olmak üzere, HKH yaşlanmasında rol oynayan birçok hücreye özgü mekanizma bulunmaktadır [16].

Yaşlı HKH'ler, rejeneratif kapasitede azalma ve miyeloid soyuna yönelik farklılaşma eğilimi dahil olmak üzere birkaç farklı fenotip sergilemektedir. Otofajide azalma ve proteazomal bozunmada azalma ile birlikte DNA hasarının birikmesi gibi metabolik değişiklikler HKH yaşlanmasını hızlandırabilir. Yaşlı HKH'ler genellikle gelişmiş mitokondri oksidatif fosforilasyon ve muhtemelen HKH işlevini tehlikeye atan artan ROS üretimi sergiler. Ancak, yüksek ROS düzeylerinin HKH disfonksiyonunun bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu dikkatle değerlendirilmelidir. Kemik iliği mikro ortamındaki değişiklikler kök hücre yaşlanmasını etkilemektedir ve gerçekten de HKH nişlerinin anatomik ve fonksiyonel yeniden şekillenmesi, yaşlanma sırasında miyeloid-soy hücre genişlemesini hızlandırmaktadır [17].

2.3. Kanserde Hematopoetik Kök Hücre Nişi

Kök hücre nişinde hematopoezin düzenlenmesine katkı sağlayan bir çok hücre mevcuttur. Şekil 2.3'te görüldüğü gibi, periarteriolar nestin (Nes)–GFPhigh hücreler, nöral–glial antijen 2 (NG2)-pozitif hücreler, miyozin ağır zincir 11 (MYH11)- pozitif hücreler, perisinüzoidal Nes–GFPlow hücreler, CXC-kemokin ligandı 12 (CXCL12), retiküler (CAR) hücreler ve leptin reseptörü (LEPR) pozitif hücreler gibi birçok vaskülatür ve bununla ilişkili stromal hücreler bulunmaktadır. Sempatik sinir sistemi sinirleri, HKH mobilizasyonunu düzenlerken miyelinsiz Schwann hücreleri ise HKH sessizliğine katkı da bulunabilmektedir. HKH düzenlemesinde görev alan hücrelerden biri olan osteoblastların moleküler sinyal mekanizması ise net olarak açıklanamamıştır fakat; bununla birlikte, lenfoid progenitörlerin düzenlenmesinde rolleri olabilmektedir. Adipositler HKH bakımını olumsuz etkileyebilen hücrelerdir. Makrofajlar, nötrofiller, düzenleyici T hücreleri ve megakaryositler gibi hematopoetik hücreler ise HKH bakımına veya mobilizasyonuna katkıda bulunabilen HKH'den türetilmiş soy hücrelerine örnektir.



Şekil 2.3: Homeostazda yetişkin kemik iliği HKH nişi. HKH aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyen çeşitli hücre tiplerini ve niş faktörlerini gösteren, homeostazdaki yetişkin kemik iliği HKH nişinin şematik gösterimi [16].

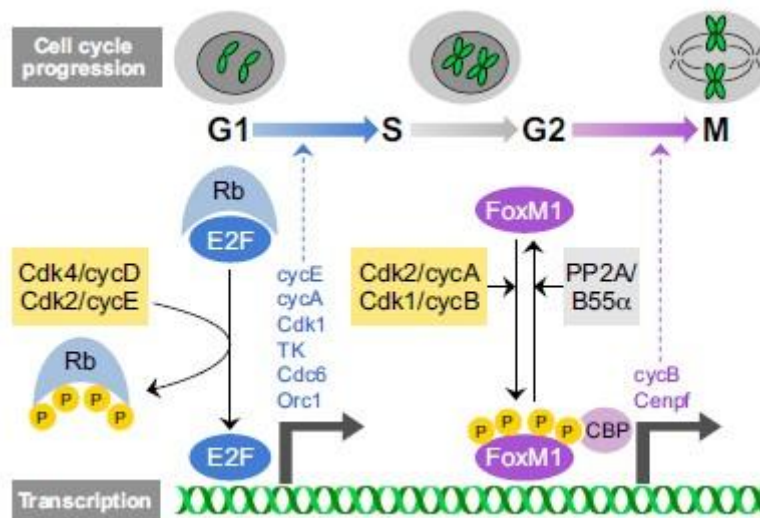
Trombosit taraflı veya miyeloid taraflı von Willebrand (Vwf)-GFP+ HKH'lerin ve Vwf-GFP-HKH'leri sırasıyla megakaryositler ve arteriyoller içeren ayrı kemik iliği nişlerinde yer alabilmektedir. HKH alt kümelerinin bu bölgesel lokalizasyonu niş bileşenlerinde neoplazinin tetiklenebileceğini veya malign hücreleri desteklemek için yeniden şekillendirilebileceğini düşündürmektedir. Şekil 2.4b ve Şekil 2.4c'de bu durum özetlenmektedir. Şekil 2.4a'da görüldüğü gibi, HKH yaşlanmasını etkileyen kemik iliği nişinin yaşlanmaya bağlı değişiklikleri arasında vaskülatürdeki ve MKPH'lerdeki değişiklikler, artan adipogenez ve azalan osteogenez, niş faktörlerinin sekresyonunun değişmesi ve adrenerjik sinirlerin sayısının azalması yer almaktadır. Yaşlanan bu HKH'ler artan miyeloid-önyargılı farklılaşma ve düşük rejeneratif kapasite sergilemektedir. Stromal niş düzenleyicilerde meydana gelen epigenetik veya genetik lezyonlar, malignite öncesi klonların büyümesini kontrol ederek, miyeloid maligniteleri destekleyen inhibitör sinyallerin kaybına yol açabilmektedir. Mieloid malignitelerin çoğuna, HKPH'lerindeki epigenetik ve/veya genetik mutasyonlar neden olmaktadır. Bu durum, normal hematopoeze rağmen, kanser hücresi büyümesini destekleyen bir kemik iliği nişinin oluşmasına yol açmaktadır. Bozulmuş MKPH farklılaşması, fibroz, vasküler yeniden şekillenme, nöropati ve stromal hücreler tarafından HKH niş faktörlerinin azaltılmış üretimi ile karakterize proinflatuar bir ortama yol açabilmektedir [16].

birçok molekülün ifadesini yükseltmektedir. Bu moleküller, kemorezistans sağlayan lösemi hücresi yapışmasına ve hayatta kalmasına aracılık eder ve bu nedenle terapötik hedefler olarak araştırılmaktadır. BCR-ABL KML hücreleri, doğrudan hücre-hücre teması ve THPO ve CCL3'ün salgılanması yoluyla MKH'lerin değişmiş osteolineage progenitörlerine farklılaşmasını indükleyebilmektedir, bu da sağlıklı HKH'leri destekleme kapasitelerini bozabilmektedir ve bunun yerine lösemi hücrelerinin büyümesini teşvik edebilmektedir [16].

2.4. Hematopoetik Kök Hücrelerde Hücre Döngüsü Özelliklerine Genel Bakış

Çoğu HKH döngüsü homeostatik koşullar altında hipoksik kemik iliği nişindeki G0 fazında bulunmaktadır. Bununla birlikte, hücre döngüsüne girdikten sonra, HKH'ler, günlük olarak veya strese yanıt olarak kan hücresi üretiminin ihtiyaçlarını karşılamak için büyük proliferatif genişleme geçiren progenitör popülasyonlara yol açmaktadır.

HKH'lerin hücre döngüsü düzenlemesi, hematopoezin ilerlemesi sırasında hayati derecede önemlidir ve HKH'lerin hücre döngüsü, kök hücre havuzunun genişlemesini sağlamak için embriyogenez sırasında aktiftir. Hematopoez, embriyogenez sırasında farklı anatomik bölgelerden gelişir ve yetişkinliğe kadar devam etmektedir. Özellikle, HKH'ler yetişkinlerde soy kısıtlı progenitöre bağlı olduklarından hücre döngüsü genellikle daha sık düzenlenmektedir. Ayrıca, hücre döngüsü düzenleyicilerinin (CDK'ler (CDK4, CDK6, CDK2 ve CDK1), Siklinler (Siklin D, Siklin A, Siklin E, Siklin B) ve CKI'ler) kök hücre kendini yenilemesinin önemli belirleyicileri olduğu bilinmektedir. Memeli hücre döngüsünü yöneten çekirdek moleküler mekanizma, siklin bağımlı kinazlar (CDK'ler) adı verilen bir serin/treonin protein kinaz ailesinden oluşmaktadır. CDK'lerin aktivasyonu, siklin düzenleyici alt birimlerle bağlanmayı gerektirmektedir. Şekil 2.5'te özetlendiği gibi, CDK/siklin komplekslerinin aktivitesi, INK4 veya CIP/KIP ailelerine ait olan CDK inhibitörleri (CKI'ler) tarafından ayrıca düzenlenmektedir. Aynı zamanda HKH döngüsü bir çok transkripsiyon faktörleri (c-Myb, GATA-2, Gli-1 ve Hox ailesi gibi) ve bazı klasik olmayan düzenleyiciler (mikroRNA'lar, hücre dışı matriks (ECM)) tarafından da düzenlenmektedir [18].



Şekil 2.5: Hücre döngüsü düzenlenmesindeki moleküler mekanizma [19].

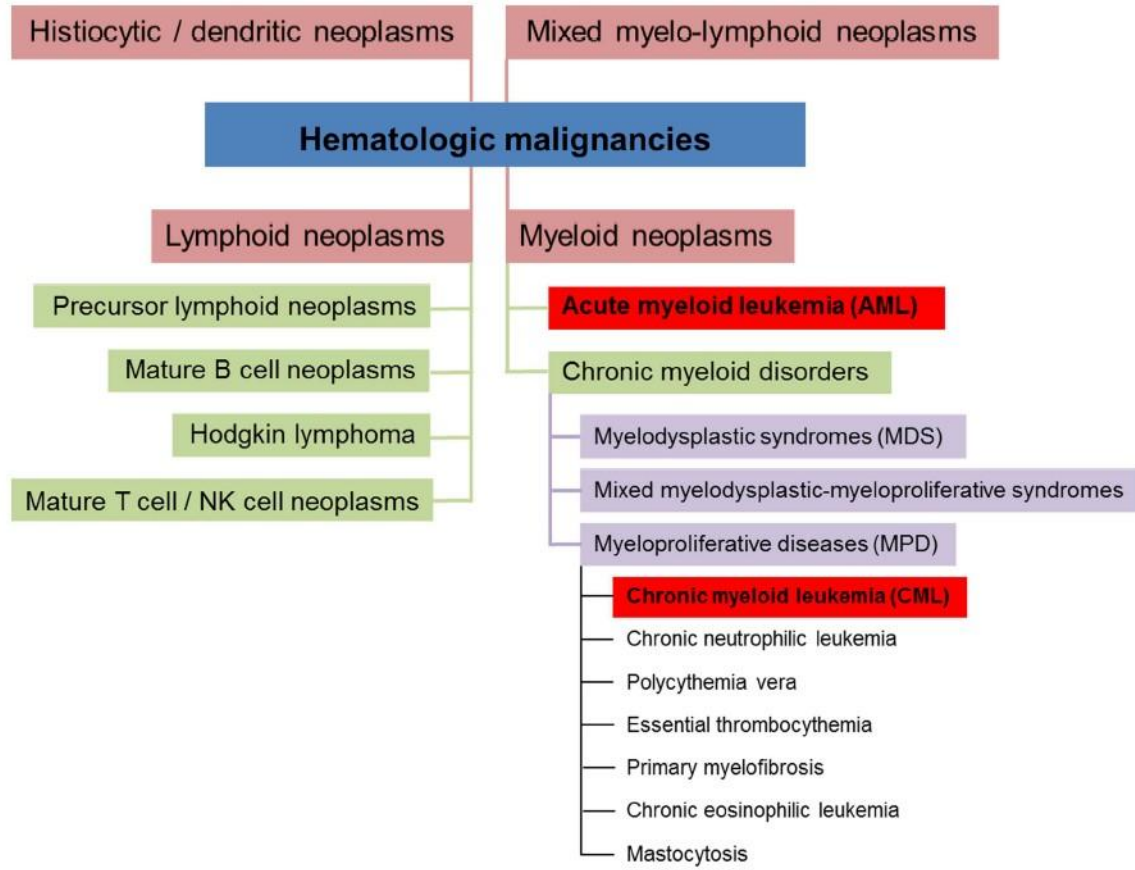
2.5. Klonal Hematopoez

HKH'lerde somatik mutasyonların edinilmesi, klonal hematopoez olarak adlandırılan premalign bir durumu tanımlamaktadır. Klonal hematopoez gelişimi için ileri yaşın etkisi, kanser kohortlarında daha yaygın olan çeşitli genotoksitite bağlamında düşünüldüğünde daha az olabilmektedir. Kanser ortamında, klonal hematopoezin gelişimi ve evrimi, genotoksik stres tarafından yönlendiriliyor gibi görünmektedir. Araştırmacıların yapmış olduğu son çalışmalar, klonal hematopoezin, kemoterapi ve radyasyon dahil olmak üzere mutajenik stres faktörlerine önceden maruz kalma nedeniyle kanser kohortlarında daha yaygın olduğunu göstermektedir.

Klonal hematopoezin kendisi klonal genişlemeyi indüklemek ve hematolojik hastalığa neden olmak için yeterli görünmemektedir. Klonal hematopoezi olan bireylerin çoğunluğunun hematolojik malignite geliştirmediği bilinmektedir. Kemoterapi, spesifik direnç mutasyonlarını barındıran hücrelere güçlü bir rekabet avantajı sağlayarak hayatta kalan HKH'lerin poliklonalitesini azaltan hücre dışı bir faktördür. Hayatta kalan bu HKH'ler, potansiyel olarak işlevsiz hematopoez ve nihayetinde lösemik dönüşüme yol açan anormal farklılaşma ve genomik kararsızlık sergilemektedir. Bu ortamda klonal hematopoez, doğal olarak tedaviye dirençli olan ve *TP53*'teki somatik mutasyonlar ve DNA hasar yanıtında yer alan diğer genler için zenginleştirilmiş klonlar tarafından tanımlanmaktadır ve ardından miyeloid neoplazm geliştirme riskini arttırmaktadır [20].

2.6. Hematolojik Maligniteler

Hematolojik maligniteler (HM'ler), genellikle anormal kan hücreleri üretimi (hematopoez) ile karakterize edilen heterojen bir kan neoplazileri grubunu temsil etmektedir [21]. Bu neoplazmalar, Şekil 2.6'da görüldüğü gibi; Miyeloid, lenfoid, karışık miyelo-lenfoid ve histiositik/dendritik neoplazmalar olmak üzere dört farklı alt gruba ayrılmaktadır [22].



Şekil 2.6: Hematolojik neoplazmların kavramsal sınıflandırması [22].

Lenfoid neoplazmalar, Non Hodgkin Lenfoma (NHL), Hodgkin Lenfoma (HL), lösemi ve Multiple Miyelom (MM) içeren çeşitli bir hastalık grubunu oluşturmaktadır [23]. Miyeloid neoplazmalar olgunlaşmamış blastlar tarafından kemik iliği infiltrasyonunun yüzdesine bağlı olarak AML ve kronik miyeloid bozukluklar olarak gruplandırılmaktadır. KML gibi kronik miyeloid bozukluklar, AML'ye dönüşme riskini taşımaktadır [22].

Akut löseminin sınıflandırılması, lösemik hücrelerin miyeloid veya lenfoid soydan olup olmadığına dayanmaktadır. Belson ve arkadaşları, löseminin patolojik ve klinik özelliklere göre; Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Akut Miyeloid Lösemi (AML), Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) olmak üzere dört ana tipe ayrılabilirliğini belirtmektedir. Bu araştırmacılar ayrıca akut lösemide anormal kan hücrelerinin olgunlaşmamış olduğunu ve normal işlevleri yerine getiremeyeceklerini belirtmişlerdir. Akut lösemide anormal beyaz kan hücrelerinin sayısı kronik lösemiden daha hızlı artmaktadır ve bu nedenle akut lösemi daha hızlı ilerlemektedir. AML, kan hücrelerinin miyeloid hattını etkileyen bir lösemi türüken ALL, kan hücrelerinin lenfoid hattını hedeflemektedir [23].

HM'ler önemli tanısal ve terapötik ikilemlere neden olan ekstrasmedüller yumuşak doku kitleleri olarak ortaya çıkabilirler [24]. Bazı durumlarda, bir hematolojik malignitenin sürdürülmesi, kemoterapiye dirençli (kemorezistans) olabilen ve bu nedenle hastalığın ilerlemesi ve nüksetmesinin ana nedenini temsil eden dönüştürülmüş HKH'lere bağlı olabilmektedir [21].

İnsan lösemisinin genetik temeline ilişkin anlayışımızda son birkaç yılda önemli adımlar atılmıştır. Lösemilerin çoğu sporadiktir, ancak hastalık alellerinin pozisyonel klonlanması, lösemik hücrelerde edinilmiş tekrarlayan kromozomal translokasyonlarla kolaylaştırılmıştır. İnsan lösemileriyle ilişkili kromozomal translokasyon sınır noktalarının klonlanması, çoğu durumda, hastalık patogeneziinde nedensel olarak yer alan füzyon genlerini tanımlamıştır. 100'den fazlası klonlanmış olan 300'den fazla tekrarlayan kromozomal translokasyon bulunmaktadır. Kromozomal translokasyonların klonlanması löseminin patofizyolojisine ilişkin önemli bilgiler sağlamasına rağmen, nokta mutasyonunun bir sonucu olarak işlevi değişen veya bozulan bir gen spektrumu bulunmaktadır. Ek olarak, hematolojik malignitelerin, haploinsufficiency gen dozajının lösemi fenotipine katkıda bulunabileceği geniş insan hastalıkları yelpazesine dahil edilebileceğine dair artan kanıtlar bulunmaktadır [25].

2.6.1. Miyeloid Maligniteler

Miyeloid lösemi (ML), genetik anormallikler ve mutasyonlar nedeniyle miyeloid hücrelerin anormal büyümesiyle sınıflandırılan heterojen bir kanserdir. Ayrıca hematopoetik kök hücrelerin klonal bozuklukları ve farklılaşması ile kategorize edilmektedir. Genel olarak, Miyelodisplastik Sendrom (MDS), Miyeloproliferatif Neoplazm (MPN) ve Kronik ML (KML) ve Akut ML (AML) gibi dört tip ML türü bulunmaktadır. Miyeloid malignitelerin arkasındaki moleküler mekanizma henüz bilinmemekle birlikte, sekans analizleri mutasyona uğramış genleri ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar sayesinde araştırmacılar, hematopoetik transkripsiyon faktörleri, spliceosomal bileşenler ve epigenetik düzenleyiciler dahil olmak üzere gen ekspresyonu düzenlemesinde yer alan faktörlerdeki genetik değişiklikleri tanımlamışlardır. Şu anda, kemoterapi ve radyasyon tedavisi gibi ağırlı süreçler ML tedavisi için etkili değildir, bu nedenle farklı ML türleri için invaziv olmayan bir biyobelirteç geliştirmeye ihtiyaç vardır [26].

Miyeloid lösemide tedavinin amacı, kalıcı bir tam remisyon sağlamaktır. Kronik faz KML için bu, çoğunlukla Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKI) tedavisi ile nispeten kolay bir şekilde elde edilmektedir; bununla birlikte, bu terapi yalnızca lösemi hücrelerinin büyük kısmını ortadan kaldırırken, LKH'ler korunmaktadır.

Klinik ve deneysel gözlemler, ML'lerin kısmen bağışıklık sistemi tarafından kontrol edildiğini göstermektedir. Lösemi hücreleri, ana doku uyumluluk sınıfı (MHC)-I ve -II moleküllerini ve CD80 ve CD86 gibi yardımcı uyarıcı ligandları ifade ederler ve bu nedenle T hücreleri tarafından tanınabilirler ve güçlü T hücresi tepkilerini indükleyebilmektedirler. Ek olarak ML'ler, IFN-alfa ve interlökin (IL)-2 gibi spesifik olmayan immün aracılı tedavilere yanıt vermektedir [22].

2.6.1.1. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

AML, kötü prognoza sahip olan kemik iliği ve periferik kandaki blastların (miyeloid progenitörlerin) klonal genişlemesi ve farklılaşması ile karakterize olan heterojen bir malignitedir [27]. Bu değişiklikler, hücrelerin farklılaşmasını engeller ve çoğalmaya veya blastların birikmesine neden olmaktadır. Blastlar normal hematopoetik dokunun yerini alarak sitopenilerin ortaya çıkmasını tetiklemektedir. Olgunlaşmamış hücrelerin birikmesi kemik iliğinde başlar, ancak çoğu durumda kanda hızla birikir ve bazen lenf düğümleri, dalak, karaciğer, testisler ve merkezi sinir sistemi gibi vücudun diğer bölgelerine yayılmaktadır [28]. AML heterojen bir hastalık olduğundan sitogenetik alt tiplerin özellikleri ile morfolojik ve klinik özellikleri kişiden kişiye çok farklı olabilmektedir. Bu da AML tedavisini

zorlaştırmaktadır [29]. AML hastaları için prognoz kısmen hastaların yaşına bağlı olmakla birlikte daha genç hastaların genel olarak sağkalım oranlarının yaşlı hastalara göre daha iyi olduğu bilinmektedir. AML ağırlıklı olarak yaşlı erişkinlerde görülmektedir ve vakaların yarısından fazlası 65 yaşından büyük hastalarda rapor edilmektedir. Nadir olsa da, çocuklarda da seyrek AML vakaları bulunmaktadır [30]. Terapötik yaklaşımlardaki (enfeksiyon kontrolü ve transfüzyon desteği dahil) gelişmeler göz önüne alındığında, AML şu anda 60 yaşın altındaki hastaların yaklaşık % 35-40'ında tedavi edilebilmektedir [27]. Fakat kemoterapiye ilk yanıtta sonra nüks bir sorun olmaya devam ettiğinden kemik iliğinde kalan kemo-dirençli lösemik hücrelerin ortadan kaldırılmasına odaklanan ve böylece relapsları önleyen yeni terapötik stratejilere ihtiyaç vardır [31].

Genetik taramalar, prognostik sınıflandırmada ve AML'deki tedavi stratejilerinin sonraki adımlarında önemli bir rol oynamaktadır. Tümör hücresindeki genetik değişiklikler, başlangıçta hastaların yaklaşık % 50'sinde sitogenetik analizle saptanabilen karyotipik anormallikler (örn., delesyonlar, translokasyonlar) lösemnin nedeni olarak kabul edilmektedir [27]. Sitogenetik ve moleküler analize dayalı olarak ve risk sınıflandırmasına göre AML'nin genetik anormallikleri üç kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar;

- 1) Dengeli translokasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, monozomiler ve trizomiler dahil olmak üzere rastgele olmayan kromozomal anomalliler,
- 2) Gen mutasyonları,
- 3) Epigenetik değişikliklerdir [32].

Yeni tanı konmuş AML hastalarının yaklaşık % 50-60'ında sitogenetik anormallikler saptanmaktadır (Dengeli translokasyonları / inversiyonları olan AML (Tablo 2.1), çeşitli sitogenetik anormallikleri olan AML (örn., delesyonlar, monozomiler ve trizomiler) ve kompleks karyotipli AML (en az 3 edinilmiş kromozomal anomaliyi temsil eder) (Tablo 2.2)). Tablo 2.1 ve 2.2 bu sitogenetik anomallilerini özetlemektedir. Bu sitogenetik anomalliler rastgele olmayan kromozomal yeniden düzenlemeler olarak kategorize edilmektedir [32].

Tablo 2.1. AML'li yetişkinlerin %55'inin lösemik blastlarında bulunan sitogenetik anormallikler (Rastgele Olmayan Kromozomal Yeniden Düzenlemeler) [32].

Kromozom anormallikleri	Gen Ürünü	İkincil Genetik Değişiklik	Klinik anlamı	Kemoterapi Önerilen
1. Dengeli kromozomal yeniden düzenlemeler artı gen mutasyonları (yani, dengeli translokasyonlar, inversiyonlar).				
(a) Çekirdek bağlayıcı faktör akut miyeloid lösemi (AML'nin %10-15'i, tedaviye iyi bir yanıt).				
inv(16)(p13.1;q22)/t(16;16) (p13.1;q22)	<i>CBFβ-MYH11</i>	-	Olumlu sonuç, indüksiyonda sitarabin-antrasiklin yanıt verenler, CR elde ediyor.	HDAC'nin yoğun remisyon sonrası CC'si.
		Trizomi 22	?	?
		<i>KIT(exon 17), RAS, FLT3</i>	Düşük ve tekrarlayan sonuçlar (örneğin genç yetişkinler), nüks riskini artırır, remisyon süresini	Yoğun CC + ikili TKi (Midostaurin), ikili SRC/ABLKİ

			kısaltır, OS için olumsuz prognostik faktör.	(Dasatinib), HDAC sonrası remisyon.
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO/RUNX1-RUNX1T1	-	Olumlu sonuç. Olumlu sonuç, indüksiyonda sitarabin-antrasiklin yanıt verenler, CR alma.	HDAC'nin yoğun remisyon sonrası CC'si.
		Delesyon 9q	?	?
		KIT (exon 17), RAS, FLT3	Daha düşük ve tekrarlayan sonuçlar (örneğin, genç yetişkinler), nüksetme riskini olumsuz yönde artırır, remisyon süresinin azalması, OS için olumsuz prognostik faktör.	Yoğun CC + ikili TKi (Midostaurin), ikili SRC/ ABLKi (Dasatinib), HDAC sonrası remisyon.
(b) Dengeli translokasyonlar/inversiyonlar ile AML'deki diğer moleküler değişiklikler.				
t(6;9)(p23;q34)	DEK-NUP214	-	Kötü tedavi sonucu.	?
		FLT3	Daha düşük CR, daha düşük DFS ve OS.	?
inv(3)(q21q26.2)/t(3;3)(q21;q26.2)	MDS1/EVI1-RPN1	-	Aşırı ifade edilen EVI1, Kötü sağ kalımın bağımsız habercisi.	?
		Monozomi 7, 5q delesyonları	?	?
		NRAS	?	?
t/inv (11q23)	MLL, LEK1, HXR, HTRX1	-	Kötü prognoz, yüksek riskli protokollere göre tedavi edilir.	?
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL-ENL	-	AML, M4 veya M5 alt tiplerinde elverişsizdir.	?
t(6;11)(q27;q23)	MLL-AF6	-	AML, M4 veya M5 alt tiplerinde elverişsizdir.	?
t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9	-	AML'de olumsuz, ancak ek anormallikleri veya M5 FAB'si olmayan AML hastalarında olumlu.	?
t(10;11)(p12;q23)	MLL-AF10 veya MLLT10	-	AML, M4 veya M5 alt tiplerinde elverişsizdir.	?
t(15;17)(q24;q21)	PML-RARA	-	Düşük riskli APL hastalarında tedaviye olumlu yanıt (ATRA + arsentrioksid), %100 CR ve %97 2 yıllık EFS.	Bir remisyon indüksiyonu olarak ATRA + arsentrioksid

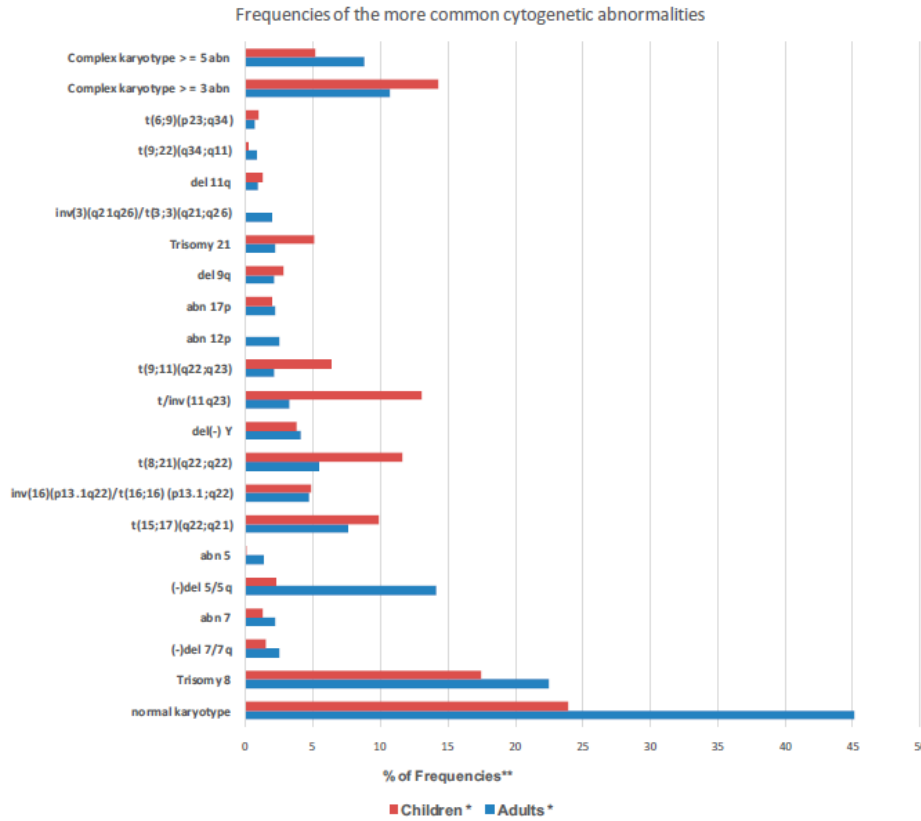
Tablo 2.2. AML'li yetişkinlerin %55'inin lösemik blastlarında bulunan diğer sitogenetik anormallikler (Rastgele Olmayan Kromozomal Yeniden Düzenlemeler) [32].

Kromozom anormallikleri	Gen Ürünü	İkincil Genetik Değişiklik	Klinik anlamı	Kemoterapi Önerilen
AML'de çeşitli sitogenetik anormallikler ile moleküler değişiklikler				?
Delesyon 9q	Sınıf I mutasyon	-	Orta risk grubu/olumsuz sonuç.	?
		<i>CEBPA/NPM1</i>	Sınıf II mutasyonlar, birbirini dışlayan.	?
Trizomi 8	Sınıf I mutasyon	-	Orta risk grubu.	?
		<i>NPM1</i>	?	?
Trizomi 11	Sınıf I mutasyon	-	Orta risk grubu/olumsuz sonuç.	?
		<i>MLL</i>	Orta risk grubu.	?
Trizomi 13,21, monozomi 7	Sınıf I mutasyon	-	?	?
		<i>RUNX1</i>	Onkogen, olumsuz/olumsuz sonuç.	?

Dengeli translokasyonlar ve inversiyonlar; inv (16) (p13.1q22) / t (16; 16) (p13.1; q22), t (8; 21) (q22; q22), inv (3) (q21q26.2) / t(3;3)(q21;q26.2), t (6; 9) (p23; q34), t / inv (11q23) ve t (15; 17) (q24; q21) içermektedir [26,30]. Bu anomaliler tek başlarına lösemiye neden olmak için yeterli değildir ve dengeli translokasyon / inversiyona eşlik etmesi için ek ikincil genetik anomalilere ihtiyaç vardır. Dengesiz translokasyonlarla rastgele olmayan kromozomal yeniden düzenlemeler, monozomilere (monozomi 7), kromozom 5 veya 7'nin (-5 / -7 AML) bir kısmının veya tümünün delesyonuna ve trizomilere (örn. 8, 11, 13 ve 21 trizomi) neden olabilmektedir. *De nova* AML'deki en yaygın trizomiler, azalan frekans sırasıyla +8, +22, +13, +21 ve +11'dir [32].

Son yıllarda, gen düzeyinde birçok mutasyon, genlerin ve mikroRNA'ların düzensiz ifadeleri tanımlanmıştır. Bu da lösemogenez mekanizmaları hakkında bilgi sağlamıştır ve AML'nin farklı sitogenetik olarak tanımlanmış alt kümeleri, özellikle sitogenetik olarak normal (CN) AML grubu içindeki moleküler genetik heterojenliği ortaya çıkarmıştır [33]. Şekil 2.7 yetişkin ve çocukluk çağı AML'sinde sık görülen sitogenetik anormallikleri göstermektedir. Görüldüğü gibi, AML'nin büyük bir alt kümesi (yetişkinlerin ~%40-50'si ve pediatrik AML'nin %25'i) sitogenetik olarak normal (CN AML) iken, bu AML hastalarında bir dizi gen düzeyinde mutasyonlar tespit edilmiştir ve bu mutasyonlar hastalığın patogenezi, teşhisi ve prognozu ile ilişkilendirilmiştir. [30,32,34]. AML'de prognozu etkileyen gen mutasyonlarından en önemlileri: *Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3 (FLT3)*, *Nükleofosmin 1*

(*NPM1*), *DNA metiltransferaz 3A (DNMT3A)*, *Tumor Protein 53 (TP53)*, *Ten- Eleven Translocation 2 (TET2)* ve *Isocitrate Dehydrogenase (IDH1/2)*'dir [31].



Şekil 2.7: Yetişkin ve çocukluk çağı AML'sinde daha sık görülen sitogenetik anormalliklerin sıklığı [32].

Mutasyonlar, esas olarak enzim aktivitesinin işlev kaybı ile ilişkili olan enzimin katalitik alanını bozmaktadır. *DNMT3A* fonksiyon kaybı mutasyonları, AML'de yaygın olarak aşırı ifade edilen HKH'ye özgü genlerin (örn. *Runx1*, *Erg*, *Myc*, *Smad3*) hipometilasyonu ile sonuçlanır ve bu da sonuç olarak HKH farklılaşmasını bozar ve lösemogeneze katkıda bulunur. HKH'nin kendini yenilemesi ve miyeloid farklılaşması için *DNMT3A* işlevi gerekmektedir. Bu yüzden *DNMT3A* mutasyonları, uzun süreli remisyona ile AML'de kalıcı oldukları gösterildiğinden, lösemogeneze erken bir olay olarak kabul edilmektedir [32,35]. Normal karyotipli AML hastalarının yaklaşık %35'inde *DNMT3A* alellerinden birinde en az tek nokta mutasyonu meydana gelmektedir [30,33]. Bu bağlamda, CN-AML grubu, prognoz önemi olan *DNMT3A* mutasyonları olan veya olmayan olmak üzere iki alt tipte kategorize edilmektedir. Klinik olarak, *DNMT3A* mutasyonları sıklıkla orta riskli AML'ye eşlik etmektedir ve burada daha düşük sonuçlarla korele olabilmektedir. Özellikle, *DNMT3A* mutasyon etkileri, remisyondan sonra HKH'lerde ve olgun hücrelerde devam etmektedir (Tablo 3) [32].

AML hastalarının yaklaşık %10-25'inde *TET2* mutasyonları meydana gelmektedir. HKH'lerde bulunan erken bir olay olarak, *TET2* inaktivasyonu, lösemi öncesi HKH'leri, klonal genişlemeyi ve

lösemogenezi indüklemektedir. *TET2* mutasyonları, *IDH1/IDH2* ile birlikte görülebilmektedir (Tablo 3). Spesifik olarak, *TET2* mutasyonları, 5hmC seviyelerinde bir azalmaya ve esas olarak yakındaki tümör baskılayıcıların güçlendirici bölgelerinde DNA metilasyonunda bir indüksiyona neden olmaktadır. *TET2* inaktivasyonu, AML'de tümör baskılayıcıların hipermetilasyonu ile ilişkilidir. *TET2* mutasyonlarının sağkalım üzerindeki prognostik etkisi tartışmalıdır [32,35].

Tablo 2.3. AML'de meydana gelen en yaygın epigenetik mutasyonların özeti [32].

Mutasyon Biyobelirteçleri	Klinik/Biyolojik Özellikler	Prognoz ve Tedavi
<i>DNMT3A</i>	Pre-lösemik HKH'lerde, enzim fonksiyon kaybı ve Runx1, Erg, Myc, Smad3'ün hipometilasyonu ile ilişkili miyeloid farklılaşmasını sınırlayan ve HKH genişlemesini destekleyen erken ve tekrarlayan değişiklik, mutasyon remisyondan sonra HKH'lerde devam eder, bu nedenle HKH farklılaşmasını bozmaktadır .	DNMTi tedavilerinde olumsuz sonuç ve kötü prognosis veya olumlu yanıt.
<i>TP53</i>	Hematolojik malignitelerde nadir, kompleks karyotiplerde çok yaygın, AML'de en önemli prognostik faktör.	Kötü prognosis: (daha düşük CR, IEF, RFS, RFR, OS)
<i>IDH ½</i>	DNA hipermetilasyon fenotipi, bloke histon demetilasyonu, neomorfik fonksiyon, olumsuz klinik sonuç ve <i>NMP1</i> ve <i>FLT3</i> mutasyonlarına eşlik ettiğinde kötü prognosis.	Genel sağkalım için olumsuz prognostik faktör, DNMTi tedavilerinde olumlu yanıt.
<i>αKGDD TET</i>	DNA hipermetilasyon fenotipi, bloke histon demetilasyonu, <i>TET1</i> mutasyonu (onkojenik rol, DNA metilasyonunu azaltır); <i>TET2</i> mutasyonu (<i>IDH1</i> / 2 mutasyonları ile birbirini dışlayan) tümör baskılayıcı rolü, esas olarak TS genlerinin güçlendirici bölgelerinde yüksek DNA metilasyonunu indükler.	DNMTi tedavilerinde daha yüksek klinik remisyon oranı ve olumlu yanıt.

Bir proteine çevrilmeyen, fonksiyonel küçük RNA molekülleri olan, hücre farklılaşması, ontogenez, inflamasyon ve anjiyogenez gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rol oynayan non-coding RNA'lar (ncRNA'lar) AML teşhisi, prognozu ve tedavisi için yeni bir umut kaynağı olmuştur [36]. Bir ncRNA olan miRNA'ların ve bunların hedef genlerinin deregülasyonunun, hücre gelişimi, farklılaşma,

çoğalma ve apoptoz süreçlerinin kritik adımlarına müdahale ederek bazı malign tümörlerde ve AML dahil olmak üzere majör hematolojik malignitelerin patogeneze aktif olarak katıldığına dair çalışmalar mevcuttur [33,36]. miRNA'lar, 'kopya sayısı değişiklikleri, kromozomal translokasyona bağlı olarak onkojenik genomik bölgeye yakınlıktaki değişiklikler, epigenetik değişiklikler, miRNA promoter bölgelerinin değiştirilmiş transkripsiyon faktörleri veya onkoproteinlerle anormal hedeflenmesi ve düzensiz miRNA'ların işlenmesi' olmak üzere beş mekanizma yoluyla AML'nin patogeneze katılmaktadır. Her AML alt tipi, kendisini diğerlerinden ayıran benzersiz bir miRNA imzası sergilemektedir. Örneğin Chen ve ark. bildirilen bir onkojenik miRNA olan miR-9'un AML hastalarında aşırı ifade edildiğini göstermişlerdir. miR-9 ifadesinin inhibisyonu, hücre büyümesini / canlılığını önemli ölçüde azaltabilmektedir ve apoptozu teşvik edebilmektedir. Emmrich ve arkd. pediatrik AML'de t (8; 21) ile önemli ölçüde aşağı regüle edilen miR-9'un tümör baskılayıcı özelliği ile karakterize edildiğini bulmuşlardır. Başka bir çalışma ile araştırmacılar, miR-10a'nın aşırı ifadesinin Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) M3 / t (15; 17) alt tipleri ve NPM1 mutasyonu ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu ve miRNA'nın aşırı ifadesi sırasında kemik iliği blastlarının daha düşük yüzdesine yol açtığını göstermişlerdir. miRNA ifade seviyelerindeki değişiklikler, aşağı yönde genlerin ifadesini değiştirerek AML lökemogenezini teşvik etmektedir [36].

2.6.1.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

KML, kemik iliğinde miyeloid hücrelerin (nötrofiller, bazofiller, eozinofiller ve bu hücrelerin öncüleri) düzensiz proliferasyonu ve ardından kan dolaşımına yayılması ile karakterize bir kan hücresi kanseridir [37]. KML tüm yetişkin lösemilerin %15-20'sini oluşturur ve %95'i, Philadelphia kromozomu olarak bilinen ve kromozom 22 üzerindeki *Breakpoint Cluster Region (BCR)* geninin, kromozom 9 üzerindeki *Abelson-1 (ABL-1)* geninin büyük bir kısmıyla birleştiği, bir kromozomal translokasyona sahiptir [38,39]. Bu olay sırasında, kromozom 9 üzerinde bulunan *ABL-1* ve kromozom 22 üzerinde bulunan *BCR* adlı iki gen, Philadelphia kromozomu ile birlikte *BCR-ABL1* adı verilen bir füzyon geni üretmektedir. Bu durum KML'nin ana tanısı belirteci olarak bilinmektedir [40]. *BCR-ABL1* füzyonu, çoklu proliferatif sinyal yollarını aktive eder ve yapısal tirozin-kinaz (TK) aktivitesi olan bir *BCR-ABL1* protein izoformlarını (p210, p190 ve p230 izoformları) kodlamaktadır. Bu anormal şekilde aktive olan kinazlar, miyeloid hücrelerin klonal genişlemesine neden olmaktadır [38,39,41]. *BCR-ABL1* kinazı, *CRKL* ve sinyal dönüştürücü gibi hücrelerel sinyal yollarını ve hücrenin hayatta kalmasından, hücre çoğalmasından ve apoptozun önlenmesinden sorumlu olan transkripsiyonun (STAT) aktivasyonunu etkinleştirebilmektedir [42,43].

KML'nin teşhisi ve ilerlemesi, tam kan sayımı testlerinde blast hücrelerinin fazlalığı ile tanımlanmaktadır. Kan ve kemik iliğinde blast hücrelerinin prevalansı, hastalığın ilerlemesi ile orantılı olarak artmaktadır. KML ilerlemesi, toplam hücre sayısındaki blast hücrelerinin yüzdesine dayalı olarak üç ana aşamaya ayrılır:

- 1- %10'dan az olan Kronik Faz (KF),
- 2- %10-19 Hızlandırılmış Faz (HF), ve
- 3- %20'den fazla olan Blast Hücreli Blast Fazı (BF) [38].

BCR-ABL1'in ilk ortaya çıktığı ve kronik faz KML'ye neden olan hücre, KML lösemi kök hücresi (LKH) olarak adlandırılmaktadır. Bu hücrenin bazı soyları, KML'nin tekrarlanmasına neden olan biyolojik özelliğe sahip olmasının yanı sıra kök hücre özelliklerine de sahip olabilmektedir veya bu özellikleri sonradan kazanabilmektedir. Bu nedenle, KML'li bir kişide sonunda 1'den fazla KML LKH olabilmektedir. Kronik faz KML'de proliferasyon düzenlenir, lösemi hücreleri normal olarak olgunlaşır ve granülosit-koloni uyarıcı ve makrofaj-koloni-uyarıcı faktörler (G-CSF ve G/M-CSF) gibi normal

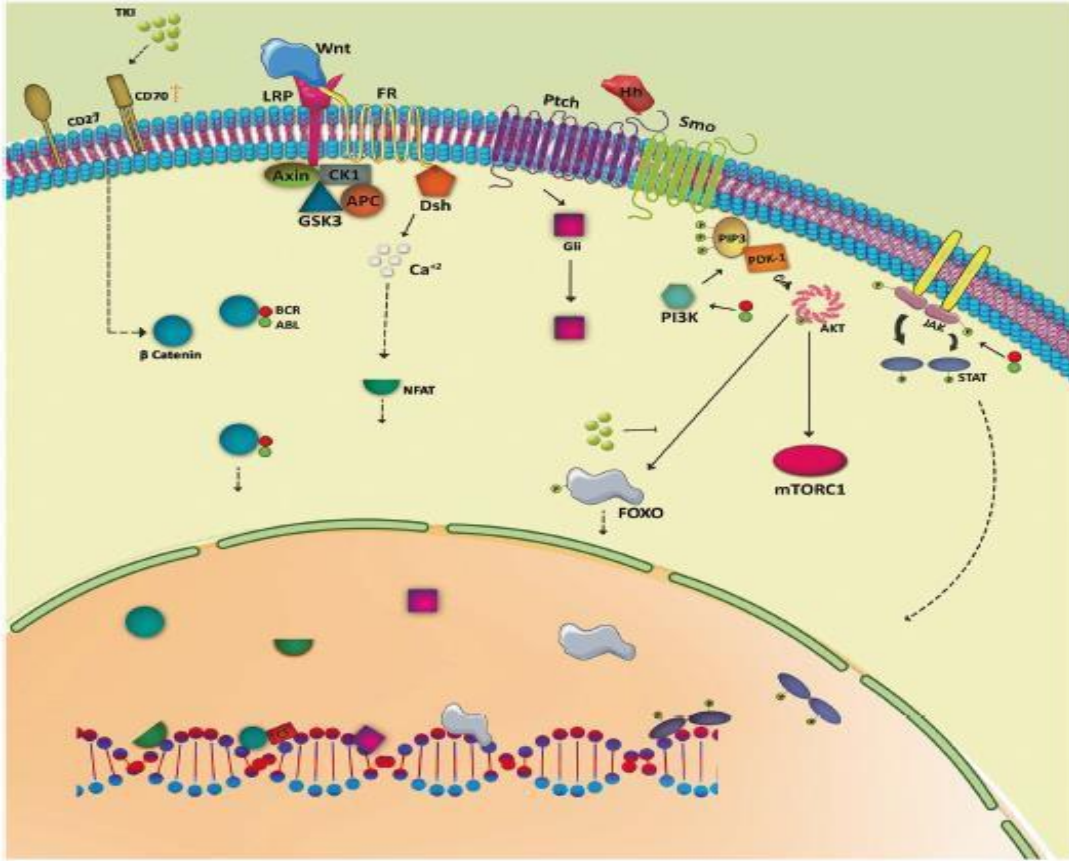
düzenleyicilere ve enfeksiyona uygun şekilde yanıt verir. Bazı veriler, KML'ye özgü artan granülosit kütlelerinin, granülopoez hiyerarşisi içindeki birkaç ekstra hücre bölünmesinden kaynaklandığını ileri sürmektedir. Tedavi edilmeyen veya etkin tedavinin olmadığı kronik faz KML, kontrolsüz proliferasyon, farklılaşma ve normal kontrol mekanizmalarına yanıt kaybı ile sonuçlanmaktadır. KML'nin bu aşaması, blast fazı veya blast krizi olarak adlandırılır ve tipik olarak AML'ye veya daha az sıklıkla ALL'ye benzer [41].

KML'nin kesin evrelemesi, tedavi yanıtı ve prognoz ile korelasyonu nedeniyle klinik bir öneme sahiptir. Blast krizi hastalarında Ph'in ötesinde ek kromozomal anormallikler sıklıkla gözlenmektedir, bu da ek mutasyonların hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Hastaların %10-15'inde trizomi 8, izokromozom 17, 22q, çift Ph veya ek materyal kaybı içeren ek kromozomal değişiklikler olduğu tahmin edilmektedir [42]. Araştırmacılar, hastalık evresine bağlı olarak hastaların %30 ila %70 arasında değişen bir bölümünün, *BCR-ABL1* kinaz alanında mutasyonlar taşıdığını bulmuşlardır. 39 blast fazı vakasında *RUNX1*, *ASXL1*, *IKZF1*, *WT1*, *TET2*, *NPM1*, *IDH1*, *IDH2*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL* ve *TP53* dahil olmak üzere 12 aday genin mutasyon durumunu analiz etmişlerdir. Bu genlerin 2'si (*IDH2* ve *NPM1*) dışında hepsinin, %33 (en sık mutasyona uğramış *RUNX1*) ile %2,6 (*CBL* ve *TP53*, en az mutasyona uğramış) arasında değişen frekanslarla mutasyonları bulundurduğunu bildirmişlerdir. Bazı hastalarda 1'den fazla gen mutasyonu olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, 26 blast fazı hastasında *Janus kinaz (JAK)-2*, *CBL*, *CBLB*, *TET2*, *ASXL1* ve *IDH1/2* kodlama dizilerini taramışlar ve 1 *CBL*, 1 *CBLB*, 4 *TET2*, 2 *ASXL1* ve 2 *IDH1* mutasyonu tanımlamışlardır. Taramaya 14 kronik faz hastasını dahil etmişler, ancak herhangi bir mutasyon bulamamışlardır. Bu nedenle kronik faz KML genetik olarak homojen bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Aynı çalışma ile, gen mutasyonlarının çoğunun Ph+ klonunun parçası olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, TKI tedavisi sırasında sonraki örneklerin hedef dizilimi, teşhis sırasında bir hastanın Ph+ hücrelerinde bulunan *DNMT3A* mutasyonunun Ph- klonunda da mevcut olduğunu ortaya koymuşlardır ve bunun *BCR-ABL1* ediniminden önce meydana gelen bir olay olduğunu öne sürmüşlerdir. *DNMT3A* gen mutasyonları, lösemi öncesi ata klonlarının oluşumuyla bağlantılı olan tek mutasyona uğrayan gen değildir. Araştırmacılar, 2012 yılında klonal hematopoezi olan ancak hematopoetik maligniteleri olmayan normal bireylerin hematopoetik hücrelerinde somatik *TET2* mutasyonlarını rapor etmişlerdir. Kanser Genom Atlası (TCGA) çerçevesinde incelenen malign tümörleri olan 2278 normal kontrol bireyin kanından elde edilen tüm ekzom verilerinin daha yakın tarihli bir analizinde; 54'ünde (%2) 19 lösemi ve/veya lenfoma ile ilişkili genlerde (*DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *ASXL1*, *TP53*, *GNAS*, *PPM1D*, *BCORL1* ve *SF3B1*) mutasyon keşfetmişlerdir [44].

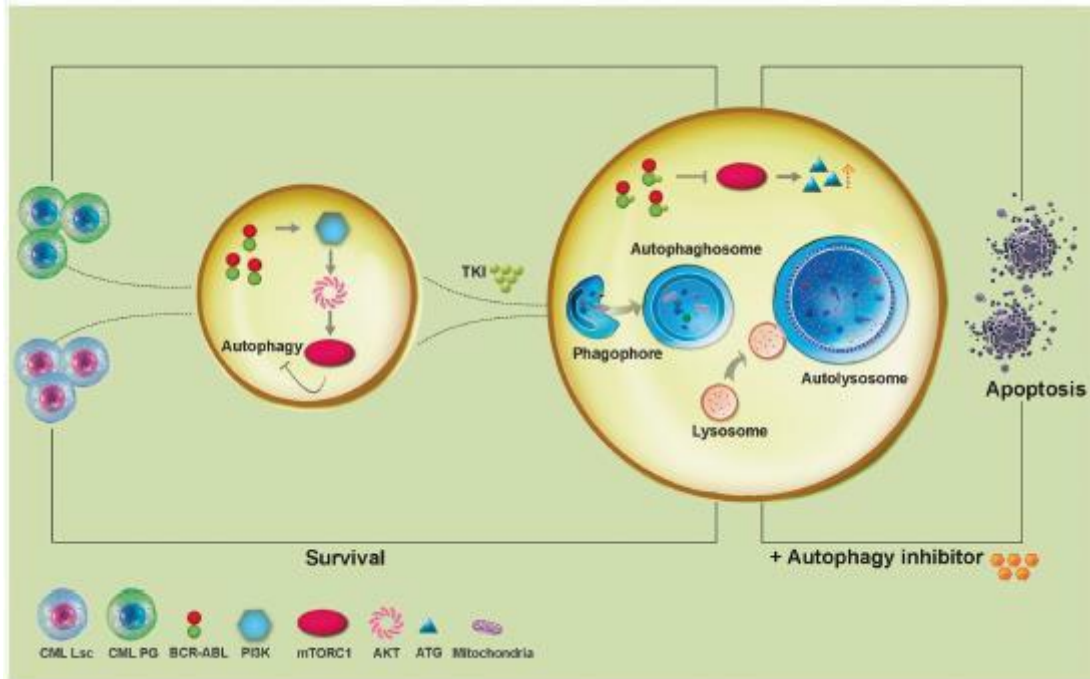
İnsan genomunda yüzlerce protein kinaz bilinmektedir ve protein kinazın tek bir adenosin trifosfat (ATP) bağlanma bölgesini hedefleyen bir ilaç gerekmektedir. Bu yüzden KML için önerilen tedavide, *BCR-ABL* onkoproteininin kinaz aktivitesini inhibe eden İmatinib gibi TKI'ler uygulanmaktadır [38,45]. TKI tedavisi, *BCR-ABL1* pozitif hücreleri hedeflemektedir ve KML hastalarının %80-90'ında hematolojik ve moleküler remisyonu indüklemektedir ve aynı yaştaki sağlıklı bireylerle karşılaştırılabilir bir sağkalım oranı sağlamaktadır. TKI tedavisine yanıt, takip sırasında belirli zaman aralıklarında gerçekleştirilen hematolojik, sitogenetik ve moleküler testlerle değerlendirilmektedir [46]. Bir TKI olan İmatinib, tasarlanmış ilk antikanser ilacıdır ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmada ve semptomları modüle etmede son derece etkilidir. Fakat *BCR-ABL*'deki duplikasyonlar veya mutasyonlar nedeniyle zamanla İmatinib direnci gelişebilmektedir, bu da kinaz aktivitesinin yükselmesine veya İmatinib'in hedefine bağlanamamasına neden olmaktadır. Bu yüzden İmatinib direnciyle mücadele etmek için ikinci ve üçüncü nesil TKI'ler (bosutinib, dasatinib, nilotinib, radotinib ve ponatinib) geliştirmişlerdir. Tüm bu bileşikler, *BCR-ABL* onkoproteininin kinaz alanındaki ATP'nin bağlanmasını bloke ederek fosforilasyonu önlerler, ancak kimyasal yapılarındaki farklılıklar nedeniyle kinaz alanındaki belirli mutasyonların varlığında farklı bir afiniteye sahiptirler. *BCR-ABL1* transkriptinin ekspresyonu, *BCR-ABL1* aracılı genetik instabilite, transkripsiyonu değiştiren proteinler, telomer uzunluğu ve diferansiyel gen

ekspresyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar, doğrudan TKI ile bağlantılı olmamasına rağmen, KML'de hastalık ilerlemesinin nedeni olarak gösterilmektedir [38,43,47].

WNT, JAK-STAT, otofaji ve Hedgehog sinyali dahil olmak üzere hücreleri *BCR-ABL*'nin inaktivasyonundan kurtarmak için alternatif sinyal yollarının aktive edilmesi, genom kararsızlığına yol açan kusurlu DNA hasarı onarım sistemleri, inflamatuvar mikroçevre ve ilaçlardaki değişiklikler TKI direncine aracılık eden mekanizmalar olarak tanımlanmaktadır [38]. Otofaji, *BCR-ABL1*-pozitif lösemide, özellikle TKI'ye dirençli tiplerde potansiyel bir hedef sunmaktadır. Otofajinin bozulması, İmatinib dirençli KML hastalarını tedavi etmek için yeni bir stratejidir. Hedgehog yolunun farmakolojik veya genetik inhibisyonu, *BCR-ABL1*-pozitif KML hücrelerinde belirgin şekilde otofajiyi indükleyebilmektedir. Hem Hedgehog yolunun hem de otofajinin inhibisyonu, KML'de ilaç direncinin üstesinden gelmek için güçlü bir yeni strateji olabileceği söylenmektedir. Önemli olarak, *BCR-ABL1* apoptozu ve otofajiyi baskılayarak *BCR-ABL1* ile dönüştürülmüş hücrelerde düşük bazal otofaji seviyelerine neden olmaktadır [39]. Şekil 2.8 ve 2.9'da KML sinyal yolları ve otofaji özetlenmiştir. P210 BCRBL1 tarafından β -katenin'in nükleusa stabilizasyonu, transdüksiyonu ve TKI tedavisinden sonra CD70-CD27'nin uyarılması, KML LKH'lerine özgü olabilmektedir. Bunun yanı sıra, WNT/ β -katenin aktivasyonu, normal sinyal mekanizması olarak kabul edilmektedir ve WNT, LRP'ye yardımcı reseptör olarak bağlanmaktadır. WNT/ Ca^{2+} /NFAT aktivasyonu, İmatinib'e karşı KML LKH direncini desteklemektedir. Aynı zamanda, Hedgehog sinyal ligandlarının Ptch reseptörüne eklenmesi, Gli ailesi transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. PI3K aktivitesinin P210 BCRBL1 tarafından indüklenmesi, PIP2'yi fosforile eder ve bu da AKT'yi aktive eden mTORC1'i fosforile eden ve FOXO transkripsiyon faktörlerini sekestre eden PDK1'in alınmasına neden olmaktadır. TKI tedavisi ile FOXO'ların çekirdek lokalizasyonunun artması ve P210 BCRBL1 tarafından JAK/STAT sinyalinin aktivasyonu KML LKH'lerin hayatta kalmasını arttırmaktadır [41]. Bu yolların TKI'lerle kombinasyon halinde ele alınması, hastalık sonucunu iyileştirebilir fakat, TKI direncinin çeşitli alt tipleri, kombinasyon tedavisinde uygun inhibitörlerin sınıflandırılması ve seçilmesi için biyobelirteçler gerekebilmektedir [38].



Şekil 2.8: KML LKH'lerinde olası sinyal yolları [41].



Şekil 2.9: KML'de otofaji. P210 BCRBL1'in PI3K-AKT ile etkileşimi otofajiyi inhibe eder. Tersine, TKI'ler, otofajiyi artıran P210 BCRBL1'in kinaz aktivitesini inhibe eder. Bu otofaji etkileri, KML progenitör hücrelerini öldürebilir ancak KML LKH'lerini koruyabilir [41].

Bazı veriler, mikroRNA'ların KML LKH'nin kendini yenilemesinde, bakımında ve TKI direncinde önemli olabileceğini belirtmektedir. Örneğin; araştırmacılar miR-126'nın normal kök hücrelerin ve KML LKH'lerin uyku halini düzenlediğini bildirmişlerdir. miR-126 inhibisyonunun, TKI tedavisi ile artan miR-126 seviyeleriyle sonuçlandığını gözlemlemişlerdir ve azalan miR-126 seviyelerinin, KML LKH'lerini TKI'ye duyarlı hale getirdiğini söylemektedirler. Ayrıca, ADAR1, bir miR öncüsü olan miR-let7'nin biyogenezini bozmaktadır ve KML LKH'lerin kendi kendini yenilemesini teşvik edebileceği öne sürülmektedir [41].

Flamant ve arkd. KML hastalarında İmatinib tedavisinin ilk 2 haftası içinde ve öncesinde kan örneklerindeki miRNA düzeylerinin önemli ölçüde değiştiğini belirtmişlerdir. Bu sonuç, miRNA imzalarının KML araştırmalarında yeni biyobelirteçleri temsil edebileceğini, KML'nin evrenlenmesine olanak tanıdığını ve hastanın TKI tedavisine yanıtını öngördüğünü göstermektedir [38].

Malign hematopoezde tanımlanan ilk olası terapötik miRNA ajanlarından biri olan ve üç üyeden oluşan (miR-29a, miR-29b ve miR-29c), miR-29 ailesi KML'de oldukça önemlidir [42]. *Bcl-2* ve *Miyeloid Hücre Lösemi Dizisi-1 (Mcl-1)*, miR-29 ailesinin potansiyel hedef genleri olarak tahmin edilmektedir. AML ve KML hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH'ler) yapılan bir çalışma ile, kontrol bireylerine kıyasla, miR-29a/29b'nin anlamlı düşük düzeydeki ifadesinin, hasta bireylerde hem *Bcl-2* hem de *Mcl-1*'in yüksek düzeyde ifadelenmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu da iki miRNA'nın miyeloid hücrelerde güçlü bir düzenleyici rol oynadığını düşündürmektedir [38,45]. Araştırmacılar miR-29b'nin, hücre proliferasyonunu baskıladığını ve hücre apoptozunu indüklediğini belirtmişlerdir. KML hasta örneklerinden elde edilen verilerle bu bulguyu desteklemişlerdir. KML'de tümör baskılayıcı olarak hareket edebilen başka bir miRNA grubu, miR-30 ailesidir (miR-30a ve miR-30e) ve doğrudan *BCR-ABL1*'i hedef almaktadır. Bu füzyon genin mRNA'sı, aşırı ifade edildiğinde hem *ABL1* hem de *BCR-ABL1* ifadesini ve lösemi hücrelerinin hiper proliferasyonunu baskılayabilen miR-30a için bir hedef olmaktadır. KML hastalarıyla yapılan bir çalışma ile araştırmacılar, hasta bireylerde kontrol bireylere kıyasla, miR-30a'nın daha az ifade edildiğini gözlemlemişlerdir. KML'de önemli bir rol oynayan ve *BCR-ABL1* ile bağlantılı olan diğer miRNA miR-199b'dir. Doğrudan *ABL1* genini hedeflemez, ancak KML hastalarında sıklıkla kaybedilen 9q34'te kromozomal bölge içinde ona sentromerik eşlenmektedir [42]. miR-21 ve miR-320a'da KML'de rol oynayan miRNA grubuna örnek verilebilmektedir. miR-21'in aşırı ifadesi, *BCL-2* gibi apoptotik birkaç proteinin ifadesinin doğrudan modüle edilmesinde rol oynarken [45], miR-320a'nın KML patofizyolojisindeki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir [42].

2.6.1.3. Miyelodisplastik Sendrom (MDS)

MDS, yetersiz hematopoez, morfolojik displazi ve periferik kan sitopenileri dahil olmak üzere kemik iliği yetmezliğine sebep olma gibi özelliklerle ortaya çıkan klonal hematopoetik bozukluklardır. Oldukça karmaşık bir patogeneze sergileyen MDS, yaşla birlikte artan bir insidans göstermektedir, bu da genellikle uygun tanıya varmayı zorlaştırmaktadır. Hastaların yaşının ileri olması nedeniyle çoğu yaklaşımlar tolere edilememektedir, bu nedenle tedavi hasta merkezli ve riske göre uyarlanmaktadır [48,49]. MDS hastalarında zamanla AML'ye dönüşüm (Örn: Sekonder AML) söz konusu olabilmektedir. Ayrıca MDS benzeri özelliklere sahip bir hastada hipoplazi veya MPN kanıtı olabileceği ilk durumda ortaya çıkabilir [48]. Sekonder AML (sAML), toplam AML vakalarının %25-35'ini oluşturmaktadır ve çoğu (%60-80) MDS'den kaynaklanmaktadır. 2016'da DSÖ hematolojik malignite sınıflandırmasında, MDS'den gelişen AML'yi, miyelodisplazi ile ilişkili değişikliklerle AML olarak adlandırılan ayrı bir klinikopatolojik antite olarak sınıflandırmıştır. sAML'ye ilerleyen MDS hastaları, *de novo* AML'ye kıyasla tipik olarak daha düşük tam remisyon, nüksüz sağkalım ve genel sağkalım oranlarına sahiptir [50]. Bu

hastaların üçte birinde bulunan AML progresyonu kötü sonuçların güçlü bir göstergesi olmasına rağmen, kalan hastaların çoğu ölümcül kanama ve enfeksiyona yol açan kemik iliği yetmezliğinden dolayı ölmektedir. Son zamanlarda, lenalidomid ve hipometile edici ajanlar gibi birkaç yeni ilaç klinik olarak kullanılmakta olup ve MDS hastalarının bir alt kümesi için iyileştirilmiş sonuçlara katkıda bulunmuştur. Bununla birlikte, hastaların büyük çoğunluğunun yaşlı olmasına ve transplantasyona uygun olmamasına rağmen ne yazık ki sadece daha genç hastalara uygulanabilen allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu dışında MDS hastaları için küratif bir tedavi mevcut değildir. Bu nedenle, etkili ancak daha az toksik tedaviler geliştirmek için MDS'nin moleküler patogenezi anılamaya ihtiyaç vardır [51].

MDS hastaları genellikle 5 yıllık bir medyan genel sağkalım ile kötü bir prognoza sahiptir. Bu kötü prognoz, yalnızca sAML'ye ilerlemeye bağlı değildir, bu da ilerleme olmadan da MDS'nin mortalite ile ilişkili olduğunu göstermektedir. MDS ve sAML'de hematopoetik hücre farklılaşması ve olgunlaşması anormaldir. AML, hematopoetik hücre olgunlaşmasında, kanda veya kemik iliğinde miyeloblast birikimine yol açan (çekirdekli hücrelerin $\geq 20\%$ 'si) bir durum ile karakterize edilmektedir. Buna karşılık, MDS hastaları olgun kan hücreleri üretmektedir, ancak olgunlaşma ve hücre morfolojisi anormaldir ve olgun hücreler sayıca azalmaktadır. Kan hücrelerinin olgunlaşmasındaki durum, MDS ve sAML arasında bir süreklilik ifade ederken, daha yüksek blast yüzdesi genellikle MDS'de daha kötü bir prognoz sağlamaktadır. MDS'yi sAML'den ayırt etmek için blast sayımı kullanmanın önemli bir sınırlaması bulunmaktadır. Bu da, blast sayımının, gözlemciler arası değişkenliğe duyarlı bir morfolojik değerlendirmeye dayanan öznel bir ölçüm olmasıdır. Ek olarak, MDS blastlarının mikroskopi ile normal blastlardan ayırt edilmesi zor olabilmektedir, bu da normal blast sayısı (örn. $\%5$ 'ten az) olan hastalarda kemik iliğinde klonal hastalığın izlenmesini veya saptanmasını zorlaştırmaktadır. Bu durumlarda, MDS'yi teşhis etmek için displazi (aynı zamanda subjektif) ve/veya genetik anormalliklerin varlığı gereklidir. Hücre ölümü ve çoğalması da MDS ve sAML arasında farklılık göstermektedir. Düşük dereceli MDS sıklıkla, etkisiz miyelopoezise katkıda bulunan inflamatuvar olmayan bir hücre ölümü olan artmış apoptoz ile karakterize edilmektedir. Son araştırmalar MDS'yi piroptoz ve nekroptoz gibi artan inflamatuvar hücre ölümü süreçleriyle ilişkilendirmiştir. Apoptozdan farklı olarak, bunlar inflamatuvar sinyalleri serbest bırakır ve hücre ölümü ile MDS hastalarında gözlenen proinflamatuvar kemik iliği ortamı arasında bir bağlantı sağlamaktadır. Buna karşılık, sAML, artan hücre sağkalımı ve proliferasyonu ile ilişkilidir. Toplu olarak, veriler, düşük dereceli MDS'de gözlenen artmış hücre ölümü fenotipinin, daha yüksek dereceli MDS ve sAML'ye ilerleme sırasında hayatta kalma yanlısı bir fenotipe yol açtığını göstermektedir [50].

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hematopoetik hücre farklılaşması, sinyal yolları, proliferasyon ve DNA hasar onarımı ile ilişkili genler dahil olmak üzere MDS ve sAML'de transkriptom, ekleme ve DNA metilasyon değişikliklerini tanımlamıştır. Bu değişikliklerin bazıları, sAML'ye ilerleme ile ilişkilendirilmiştir [50]. Bu özellikler, örtüşen özelliklere sahip vakalarda doğru tanı koymaya yardımcı olabilmektedir. MDS/MPN örtüşme bozuklukları, DSÖ sınıflandırma şemasına göre MDS ve MPN'den farklı olarak kabul edilmektedir. Çok farklı klinik belirtilere sahip tanıları ve genel prognozu içermektedir. Ortak özellikleri, bir veya daha fazla kan hücresi sayımında bir yükselmeye ek olarak hücrel displazi veya sitopenileri içermektedir [48].

Yapılan genetik çalışmalar, çoğunlukla MDS vakalarının yaklaşık $\%50$ 'sinde bulunan karyotipleme ile tespit edilen sitogenetik anormalliklere odaklanmıştır. $t(8;21)(q22;q22)$, $t(15;17)(q22;q21)$, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ ve $11q23$ içeren translokasyonların baskın olduğu görülmüştür ve MDS'deki anormalliklerin çoğu dengesiz translokasyonlardır, bu da kopya sayısı anormallikleri, yani kromozomal materyal kazanımları veya kayıpları ile sonuçlanmaktadır. $7/del(7q)$ ve $-5/del(5q)$, ardından $+8$, $dup(1q)$, $del(20q)$, $del(11q)$, $del(12p)/t(12p)$, $del(17p)/iso(17q)$, $del(18q)$,

+21q kazançları ve del(13q), ve +der(1;7)(q10;p10) bunlar arasında en yaygın olanlarıdır. Bu lezyonların çoğu sıklıkla kompleks karyotipler olarak adlandırılan karmaşık anormalliklerin bir parçası olarak birlikte ortaya çıkmaktadır. Birden fazla (≥ 3) kromozom veya kromozomal kol/segment içeren kompleks karyotiplere sıklıkla *TP53* mutasyonu (yaklaşık %40-50) eşlik etmektedir ve bu özellikle -5/del(5q) ve del(17p) söz konusu olduğunda genellikle kötü klinik durumla sonuçlanmaktadır. Nadir olarak, miyelodisplazinin net morfolojik kanıtı olmasa bile benzersiz klinikopatolojik özelliklerle ilişkili ve MDS için yüksek tanılal değerlere sahip olan (< ~%2-3) t(3;21) (q26;q22), inv(3) (q21q26), t(3;3) (q21;q26), t(1;3) (q36;q21), ve t(6;9)(q22;q34) dahil olmak üzere tekrarlayan karşılıklı translokasyonlar gösterir [52]. MDS ile ilişkili sitogenetik anormallikler, *de novo* AML'de daha yaygın olan dengeli yeniden düzenlemelerin (örneğin, t(15;17), t(8;21), inv(16)) aksine, sıklıkla kopya sayısı anormallikleri (CNA'larla) ile sonuçlanmaktadır. Ek olarak, MDS ve sAML'de daha küçük CNA'lar (<20 kb) ve kopya sayısı nötr heterozigotluk kaybı (LOH veya uniparental dizomi [UPD]) meydana gelir ve bunlar tek nükleotid polimorfizm dizileri kullanılarak tespit edilebilmektedir [50].

2000'lerin başına kadar, *NRAS*, *TP53*, *RUNX1* ve *ATRX* gibi yalnızca bir kaç genin MDS'de mutasyona uğradığı biliniyordu. O zamandan beri, moleküler teknikler ile desteklenen, *NPM1*, *TET2*, *CBL*, *EZH2*, *FLT3*, *KRAS*, *MPL*, *ASXL1*, *PTPN11*, *KRAS* ve *KIT* dahil olmak üzere bir dizi ek mutasyonel hedef, araştırmacılar tarafından 2010 yılına kadar MDS'de tanımlanmıştır. Hem driver hem de non-driver mutasyonlar dahil olmak üzere, MDS hastaları, kodlama dizisi içinde medyan 9 somatik gen mutasyonu veya tüm genom boyunca yaklaşık 1.500 gen mutasyonu taşımaktadır ve mutasyon sayıları hastalık alt tipine göre değişim göstermektedir. Şimdiye kadar MDS patogenezinde rol oynayan 30'dan fazla driver gen tanımlanmıştır (Şekil 2.10). Tipik bir MDS hastası 2-3 driver gen mutasyonu barındırırken, yüksek riskli MDS (MDS-EB and MDS-MLD) ve KMML, artan sideroblastlar (RS) olan veya olmayan MDS-SLD ve izole del(5q) ile MDS dahil olmak üzere düşük riskli MDS ile karşılaştırıldığında daha yüksek sayıda driver gen mutasyonu gösterme eğilimindedir [52].

Tablo 2.4'de hedef driver genler, RNA splicing, DNA metilasyonu, transkripsiyon, kromatin modifikasyonu, sinyal iletimi, DNA onarımı ve diğer yollar ve moleküller dahil olmak üzere birkaç ayrı fonksiyonel yolak olarak kategorize edilmiştir [52]. *TET2*, *EZH2*, *TP53*, *CBL* ve *RUNX1* MDS'de sıklıkla mutasyona uğramaktadır. En sık mutasyona uğrayan yollara odaklanıldığında, MDS hastalarının %65'inde RNA splicing (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) mutasyonlar, ardından %47'sinde DNA metilasyon genlerinde (*DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*) ve %28'inde histon modifikasyon genlerinde (*ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*) mutasyonlar olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, bu mutasyonların sıklıkları, MDS ve birincil AML arasında önemli ölçüde farklıdır; MDS'de ekleme faktörlerinde ve epigenetik düzenleyicilerde mutasyonların aşırı temsili varken, reseptör tirozin kinazlardaki (örn., *FLT3*), RAS yolu genlerindeki ve *CEBPA* ve *IDH1/2* mutasyonlarındaki mutasyonlar AML'de daha yaygındır [53].

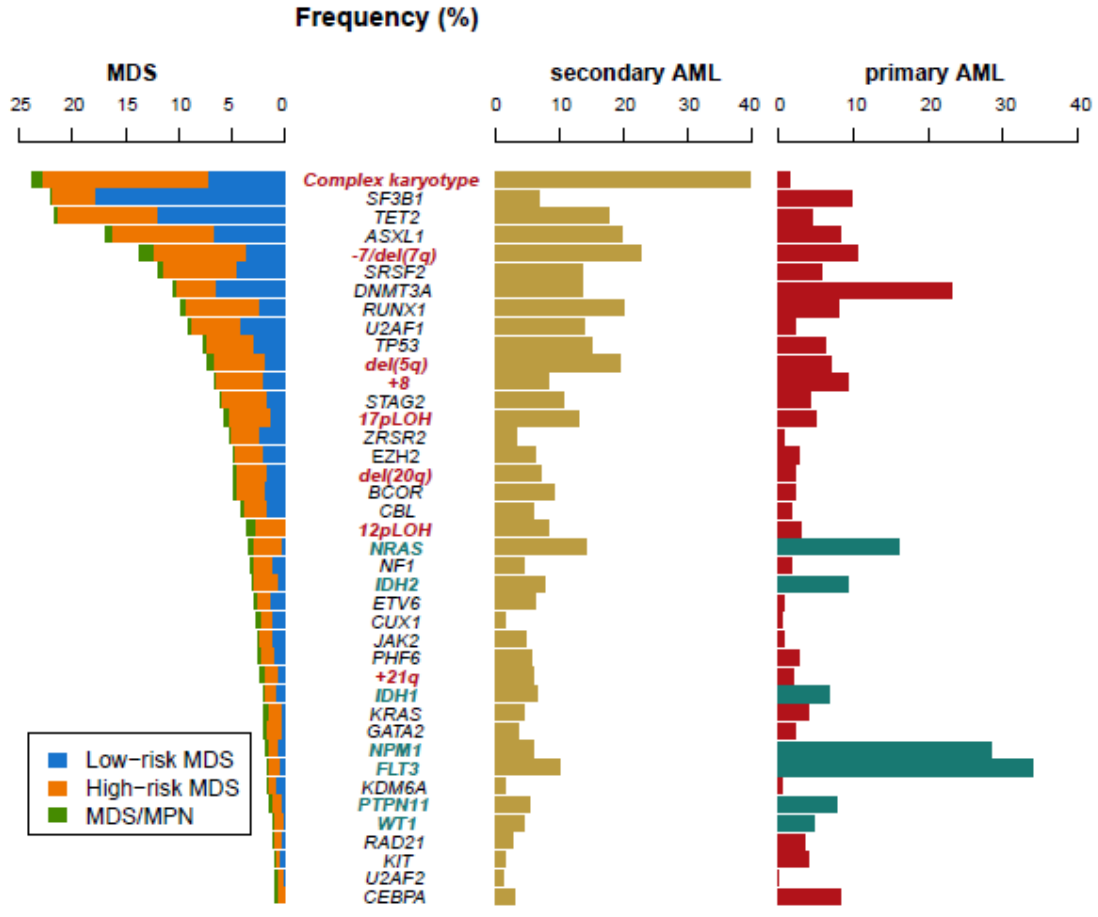
Tablo 2.4: Major driver genler [52].

Yol/Fonksiyonlar	Driver Genler
DNA metilasyonu	<i>DNMT3A, TET2, IDH1*</i> , <i>IDH2*</i> , <i>WT1</i>
Kromatin modifikasyonu	<i>EZH2, SUZ12, EED, JARID2, ASXL1, KMT2, KDM6A, ARID2, PHF6, ATRX</i>
RNA splicing	<i>SF3B1, SRSF2, U2AF1, U2AF2, ZRSR2, SF1, PRPF8, LUC7L2</i>
Kohezin kompleksi	<i>STAG2, RAD21, SMC3, SMC1A, (PDS5B, CTCF, NIPBL, ESCO2)</i>
Transkripsiyon	<i>RUNX1†, ETV6†, GATA2†, IRF1, CEBPA, BCOR, BCORL1, NCOR2, CUX1</i>
Sitokin reseptörü/Tirozin Kinaz	<i>FLT3, KIT, JAK2, MPL, CALR, CSF3R</i>
RAS sinyali†	<i>PTPN11, NF1, NRAS, KRAS, CBL, (RIT1, BRAF)</i>
Diğer sinyalizasyon	<i>GNAS, GNB1, FBWX7, PTEN</i>
Kontrol noktası/hücre döngüsü	<i>TP53, CDKN2A</i>
DNA onarımı	<i>ATM, BRCC3, FANCL</i>
Diğerleri	<i>NPM1, SETBP1, DDX41†</i>

* DNA metilasyonunu etkileyen mutant IDH1 ve IDH2'dir, ancak mutasyona uğramamış formlar değildir.

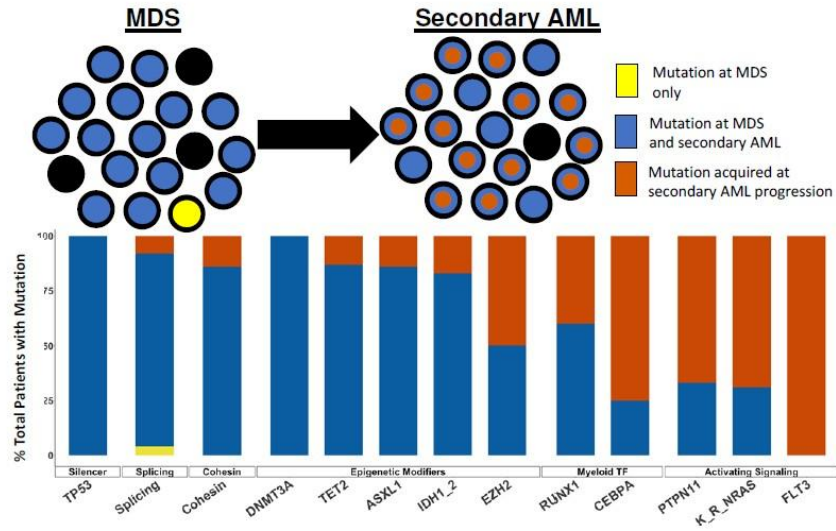
† Germline varyantları, AML/MDS'ye yakınlıkla ilişkilidir.

Şekil 2.10 ve Şekil 2.11 bu mutasyoların frekanslarının sıklığını daha ayrıntılı bir şekilde göstermektedir [50,52]. MDS'den sAML'ye ilerleme sırasında sıralı mutasyon birikimi için bir model gösterilmektedir. Şekil 2.11'de görüldüğü gibi, MDS'de siyah hücreler normaldir. Mavi hücredeki mutasyonlar erken kazanılmıştır, kurucu klonu tanımlar ve MDS teşhisinde kemik iliğinde en çok bulunan klon olmak için genişlemektedir. Bu hücreler daha sonra turuncu mutasyonlar kazanır ve bir alt klon oluşturur daha sonra sAML'ye ilerleme anında genişler. Spesifik fonksiyonel kategorilerdeki mutasyonlar, çoğu *TP53*, epigenetik değiştiriciler ve spliceosome gen mutasyonlarının MDS'de mevcut olmasıyla (örneğin, *DNMT3A* mutasyonlarının %100'ü mavidir), transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlar (örneğin, *RUNX1*, *CEBPA*) ve aktive edici sinyal genleri (*RAS* ailesi, *PTPN11*, *FLT3*) tipik olarak genişler ve ortaya çıkar (örneğin, *FLT3* mutasyonlarının %100'ü turuncudur). Bu, mavi mutasyonların erken kazanıldığı ve MDS teşhisi sırasında kemik iliği hücrelerinin çoğunda mevcut olduğu, ardından ya genişleyen ya da edinilen ve ilerlemede genişleyen turuncu mutasyonların izlediği tipik bir mutasyon edinim sırasını göstermektedir [50].

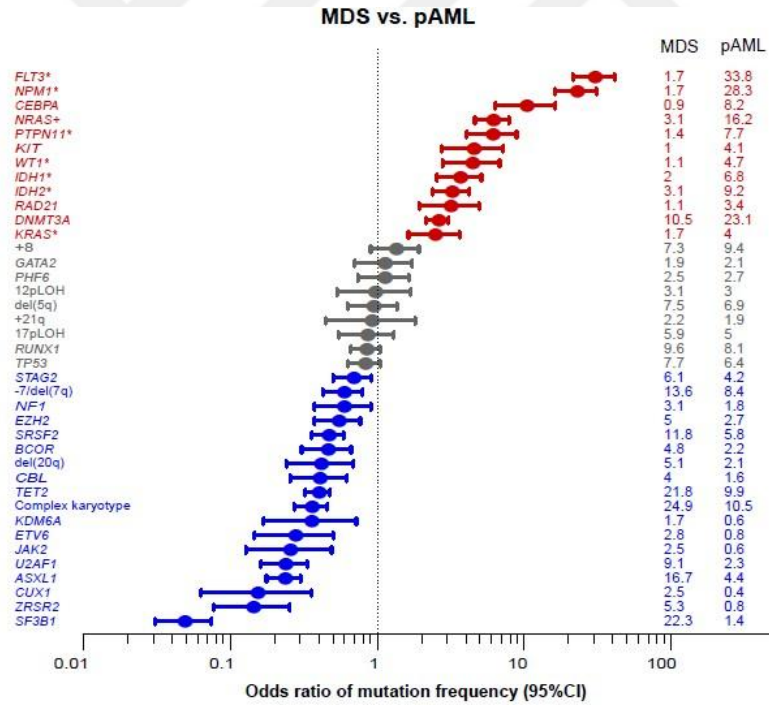


Şekil 2.10: MDS ve diğer miyeloid neoplazmlarda yaygın driver mutasyon değişiklikleri [52].

A)



B)



Şekil 2.11: a) MDS ve sAML arasındaki mutasyonların sıklığı. b) MDS ve pAML arasındaki mutasyonların sıklığı. Odds oranları ve MDS (MDS/PN dahil) ve pALM arasındaki ana driver mutasyonlarının ve CNA'ların sıklıklarının aralıkları [50].

2.6.1.4. Miyeloproliferatif Neoplazmalar (MPN)

MPN'ler, Polisitemiya Vera (PV), Esansiyel Trombositopeni (ET) ve Primer Miyelofibroz (PMF) çeren klonal kök hücre kaynaklı hastalıklardır [54]. MPN'ler ilk olarak 1892'de Vasquez tarafından tanımlanmıştır. ET ve PMF olarak bilinen MPN'ler, ayrı klinik hastalıklar olarak ifade edilmiştir. 1951'de Dameshek, görünüşte ayrı olan bu bozuklukları birbiriyle ilişkili olarak tanımlamıştır ve Miyeloproliferatif Sendromlar kavramını ortaya koymuştur. Sonraki çalışmalar, hemoproliferasyona etki eden faktörlerin anlaşılmasında büyük ilerlemelere yol açmıştır. Bu, 2005 yılında yapılan bir çalışmayla ortak *JAK-2* alelinde bir tirozin kinaz mutasyonunun tanımlanmasıyla doruğa ulaşmıştır [55]. Bu klasik MPN'lerde, ET'den PV'ye, MF'ye ve AML'ye dönüşüme kadar bir biyolojik sürekliliğin farklı fenotipik etkilerinin olabileceğini öne sürmüşlerdir [56]. DSÖ 2008'de MPN'lerin sınıflandırılmasında; klinik parametreler, kemik iliği morfolojisi ve genetik veriler olmak üzere üç dönüm noktası bildirmiştir. MPN'lerin altında yatan genetik lezyonların genişletilmiş panoraması ve hastalık seyrine ilişkin klinik çalışmalardan elde edilen veriler, 2016'da yeni bir DSÖ sınıflandırmasına yol açmıştır. 2008 ile 2016 arasında geçen sürede toplanan yeni kanıtlar şunları içerir:

- ET ve PMF'de *JAK2* ekson 14 ve *MPL* mutasyonları dışındaki *CALR* mutasyonlarının keşfi,
- PMF'de sağkalım üzerinde etkisi olan ek klonal belirteçlerin tanımlanması,
- ET ile fibrozuz prefibrotik/erken PMF (PMF öncesi) arasındaki ayrım,
- PV hastalarının takibi sırasında olayların öngörülmesinde hematokritin rolü,
- PV kemik iliği morfolojisi olan ancak hemoglobin (Hb) düzeyi erkeklerde 18,5 g/dL'den veya kadınlarda 16,5 g/dL'den düşük olan hastaların tanımlanması ve
- Minör kriterlerin tanımlanmasındaki belirsizlik ve bunlardan bazılarının güvenilirliği (endojen eritroid kolonileri) [57].

MPN'ler arasındaki ortak özellikler arasında miyeloproliferasyon, splenomegali, lösemiye ilerleme potansiyeli veya miyelofibrozis ve trombohemorajik olaylara yönelik eğilimler yer almaktadır. MPN hastalarının genel popülasyonla karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek arteriyel ve venöz tromboz oranlarına sahip olduğu iyi bilinmektedir. Trombotik komplikasyonlar, yaşam kalitesini etkileyen mikrovasküler olayları ve morbidite ve prognoza katkıda bulunan makrovasküler olayları içermektedir. Pro trombotik ve kronik inflamatuvar durumlar, bu hastalarda artmış kardiyovasküler mortaliteye katkıda bulunmaktadır. MPN tanısı sırasında veya öncesinde majör trombozun genel prevalansının PV'de %34-38,6, ET'de %9,7 ve PMF'de %13 olduğu tahmin edilmektedir. MPN tanısından sonra kümülatif tromboz oranının, PV ve ET'de hasta-yıl başına yaklaşık %3 ve PMF'de hasta-yıl başına yaklaşık %2 olduğu söylenmektedir [54]. Fakat tromboz, yetişkinlere kıyasla daha düşük oranlarda olan, pediatrik hastaların %15'inde meydana gelmektedir. Akut lösemiye dönüşüm, pediatrik MPN'lerde oldukça nadir görülmektedir [58].

MPN hastalarının yönetimi, spesifik hastalık tipini, bireyselleştirilmiş prognozu, komorbiditeleri, yaşı ve mevcut tedavilerin risk ve faydalarını göz önünde bulundurarak karar vermeyi içermektedir. PV ve ET'li hastalarda tedavinin ana hedefi trombotik riskin azaltılmasıdır. MPN'li hastaları daha iyiye götürmek/iyileştirmek için hücre metabolik ve apoptotik yolları ve hücre döngüsünün farklı aşamalarını hedefleyen çeşitli terapötik sınıflardan ajanları belirlemek için çok sayıda çalışma halen devam etmektedir [59].

MPN'li hastalarda proinflamatuvar ortam da, trombotik eğilimlerine katkıda bulunmaktadır. MPN'li hastalarda, interlökin (IL)-2 ve IL-6 ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) gibi dolaşımdaki sitokinlerin artan seviyeleri vardır. PV ve ET'li hastalarda oldukça hassas bir akut faz reaktanı olan C-reaktif proteindeki yükselmeler, majör bir tromboz oluşumu ile önemli ölçüde ilişkilidir. Bu nedenle, MPN'li hastalarda artan trombotik potansiyelin etiyolojisi, artan kan sayımları, kronik inflamasyon,

JAK2 mutasyonlu endotelyum ve anormal trombositnötrofil etkileşimlerini içeren faktörlerle çok yönlüdür [60].

MPN'lerin patolojisinin merkezinde, çoğunlukla birbirini dışlayan driver mutasyonlarının neden olduğu, yapısal olarak aktive edilmiş bir Janus kinaz ve Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon proteinlerinin Aktivatörü (JAK-STAT) sinyal yolu bulunmaktadır (*JAK2 V617F*, *MPL W515L/K*, *CALR* ekson 9 indelleri veya JAK/STAT sinyal yolu içindeki diğer daha az bilinen mutasyonlar gibi) [59]. *JAK2V617F* edinimi her yaşta ortaya çıkabilir, ancak miyeloproliferatif neoplazmalar 50 yaşından önce nadirdir ve üç tipten ikisi (polisitemi vera ve esansiyel trombositoz) esas olarak kadınlarda görülmektedir [61]. JAK-STAT yolunu aktive eden driver mutasyonları (en yaygın olarak *JAK2V617F*, ardından *CALR* ve *MPL* mutasyonları) ve ek somatik mutasyonlar (*TET2*, *ASXL1*, *IDH1*, *IDH2*, *CBL*, *IKZF1*, *LNK* ve *EZH2* dahil ancak bunlarla sınırlı değildir) dahil olmak üzere MPN ile ilişkili birçok mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar tanı koymaya yardımcı olur ve hastalık patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunur. Ayrıca prognoz hakkında bilgi vermektedir [54]. 60 yaşından sonra, miyeloid ve miyeloproliferatif neoplazmaların insidansı, artan *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2 V617F* ve *TP53* mutasyonları insidansı ile bağlantılı olarak katlanarak artar. Bu yaş grubunda miyeloproliferatif neoplazmalar erkeklerde kadınlara göre daha sık görülür ve primer miyelofibroz ve akut lösemi ile ilişkilidir [61].

2.6.1.4.1. Polisitemiya Vera (PV)

PV, ET ve HKH'den kaynaklanan PMF ile ortak noktaları paylaşan, morfolojik olarak normal kan hücrelerinin aşırı üretimi ile hematopoezin yapıcı aktivasyonu, ekstremiteler hematopoez eğilimi ve miyelofibroz veya akut lösemi ile kemik iliği yetmezliğine dönüşümü mümkün olan kronik bir miyeloproliferatif neoplazmadır [62]. İlk olarak 1892'de tanımlanan PV en yaygın MPN türüdür. Yaşa bağlı olarak 2.5-10/100.000 kişi insidansı ile PV nadir görülen bir hastalık değildir ve buna rağmen PV patofizyolojisinin anlaşılması da dahil olmak üzere şu anda PV'nin nasıl teşhis edileceği ve hatta nasıl tedavi edileceği konusunda net bir şey yoktur. PV, ET ve PMF, HKH bozukluklarıdır ve HKH fizyolojisine ilişkin son çalışmalar, bunların görünür fenotipik değiştirilebilirliklerini kısmen açıklamıştır. Bu, PV ve ET'nin ayrı bozukluklar olmadığını, aksine bir sürekliliği temsil ettiğini ve tek başına klinik fenotipe dayandığını savunan hatalı iddiayı çürütmektedir [62]. PV'li hastalarda çoğunlukla tromboembolik komplikasyonların ortaya çıkması ve miyelofibrozise veya AML'ye dönüşüm söz konusudur. Bu nedenle doğru ve erken teşhis çok önemlidir. PV daha ileri yaşta bir hastalık olmasına rağmen (ortanca tanı yaşı 60'tır) daha genç yaşta da ortaya çıkabilir ve PV'li hastaların medyan genel sağkalımı oldukça düşüktür [63].

Çoğu hasta, rutin kan testlerinde tesadüfi bir bulgu olarak yüksek hemoglobin veya hematokrit seviyeleri ile tanı anında asemptomatiktir. Baş ağrısı, baş dönmesi, görme bozuklukları, kaşıntı ve erken doyma gibi hastalıkla ilgili semptomlar spesifik değildir. Hastalar ayrıca tromboz veya kanama gibi PV komplikasyonlarıyla da başvurabilirler. Büyük bir uluslararası çalışma, PV'li hastaların sırasıyla %16, %7 ve %4'ünde tanı anında arteriyel trombotik komplikasyonlar, venöz tromboz ve majör kanama bildirmiştir. Gastrointestinal belirtiler, genel popülasyona kıyasla PV'li hastalarda daha yaygındır [63].

PV'nin nedeni belirsizdir ve belirli mutajenlere (örneğin iyonlaştırıcı radyasyon ve benzeri) maruz kalma risk faktörleri olarak gösterilmiştir. Buna rağmen, PV'li hastaların çoğu bu tür risk faktörlerine maruz kalmamaktadır. PV hastalarının büyük çoğunluğunda (%95'inden fazlasında), ekzon 14'te *JAK2* geninde *JAK2V617F* olarak adlandırılan ve yapısal olarak aktif bir tirozin kinaza yol açan somatik bir mutasyon vardır. Hastaların yaklaşık %3'ü ise, *JAK2* geninin 12. ekzonunda nokta mutasyonlarını ve küçük insersiyon veya delesyonları içermektedir [63,64]. *JAK2V617F* mutasyonu, 3

ana sitokin reseptörü olan EPOR, MPL ve G-CSFR'nin aktivasyonu ile ilişkilidir. Bu reseptörlerin aktivasyonu, artan kırmızı kan hücresi (KKH), trombosit ve granülosit üretimi ile sonuçlanmaktadır. *JAK2V617F* ifadesinin kapsamı, hastalığın fenotipini belirliyor gibi görünmektedir. *JAK2V617F*'nin düşük ifadesi, ET benzeri bir fenotip ile ilişkilendirilirken, daha yüksek ifadesi, PV benzeri bir fenotip ile ilişkilidir. *JAK2*'nin PV için bir driver mutasyonu olduğu düşünülmektedir ve 2008'den beri DSÖ tanı kriterlerinde yer almaktadır [63].

Ekzon 14 *JAK2V617F* mutasyonu, *JAK2* proteininin oto-inhibitör JH2 psödokinaz alanını etkiler ve *JAK2* ve *JAK/STAT* sinyalleşmesinin yapıcı aktivasyonuna yol açmaktadır, ekzon 12 *JAK2* mutasyonları, *JAK2* aracılığıyla daha güçlü liganddan bağımsız sinyalleşmeyi indükler ve daha yüksek seviyelerde *JAK2*, *ERK1* ve *ERK2* üretir. *JAK2V617F* mutasyonlu vakalarda ekzon 12 mutasyonlu vakalara kıyasla bazı hematolojik ve klinik farklılıklar var gibi görünmektedir. *JAK2V617F* allel yükünün miktarı, PV'de önemli ölçüde değişmektedir. Bazı çalışmalar, *JAK2V617F* allel yükünün, özellikle PV'deki homozigotluk durumunun, bazı hematolojik ve klinik parametreler üzerinde etkisi olduğunu ileri sürmektedir. PV vakalarının %30'a kadarı, kazanılmış tek ebeveynli kromozom 9p dizomisini ve bunun sonucunda PMF'de de meydana gelen ancak ET hastalarında nadiren görülen *JAK2* mutasyon homozigotluğunu göstermektedir [64].

PV, *JAK2V617F* ifadesinin bir eritrositoz, trombositoz ve granülositoz fenotipi ile nihai sonucu olmasına rağmen, bazı PV hastalarında fenotip eritrositoz ve trombositoz ile sınırlıdır. PMF hastaları PV'ye ve ET hastaları PV'ye dönüşebilir. Bunlar gibi dönüşümler genellikle tanıdan sonraki 12 yıl içinde ortaya çıkar ancak çok daha uzun sürelebilmektedir. PMF'den PV'ye dönüşüm nadir olmakla birlikte, özellikle kadınlarda ET'den PV'ye dönüşüm, *JAK2V617F* pozitif ET hastalarının yaklaşık %20-30'unda meydana gelmektedir [62].

JAK2 dışındaki mutasyonların PV'nin oluşumu ve prognozu üzerindeki etkisi, yeni nesil dizileme ve diğer bütün genom analiz teknikleri kullanılarak yakın zamanda açıklanmıştır. İlgili genler arasında en sık mutasyona uğrayanların *TET2* ve *ASXL1* genleri olduğu bilinmektedir. *ASXL1*, *SRSF2* ve *IDH2*'deki mutasyonlar, daha kötü bir prognozla ilişkili olduğundan sağ kalım oldukça azdır [63].

2.6.1.4.2. Esansiyel Trombositemi (ET)

ET, belirgin trombositoz, trombotik ve hemorajik risk ve yapısal semptomlarla karakterize bir kronik Philadelphia negatif MPN'dir [65]. Hastalığın kadınlarda erkeklerden daha yaygın olduğu görülmektedir. Her yaşta ortaya çıkabilmesine rağmen, ET insidansı yaşla birlikte artmakta ve 50 ile 70 yaşları arasında pik yapmaktadır [66]. ET hastaları, diğer MPN'lere ve Akut Lösemiye hastalık evrimi açısından düşükte olsa bir risk taşımaktadır [65]. Tanı konmamış ET ile başvuran hastaların çoğu, başvuru sırasında asemptomatiktir. Semptomatik hastalarda en sık görülen semptomlar baş ağrısı, görme bozukluğu ve baş dönmesidir. Vasküler komplikasyonlar da nispeten yaygın semptomlardır. Bunlar kolay kanama ve morarmadan eritromelaljiye, oküler migrenlere ve geçici iskemik ataklara kadar değişebilmektedir. Daha önemli vasküler komplikasyonlardan tromboz (%20) kanamadan (%10) daha yaygındır. Arteriyel tromboz, venöz trombozdan daha yaygındır [66]. ET, diğer MPN'lerle karşılaştırıldığında genel olarak olumlu prognoz ile karakterize edilmektedir [65]. Genel sağkalım, genç hastalarda daha iyidir; yakın tarihli bir çalışmada, 41-60 yaşları için 22 yıl ve 60 yaşından büyükler için 11 yıl ile karşılaştırıldığında, 40 yaşın altındakiler için 35 yıllık bir genel sağkalım tahmin edilmektedir. 60 yaşın üzerindeki ise daha düşük bir lösemik dönüşüm ve miyelofibroz oranı ile ilişkilendirilmiştir, ancak daha genç hastaların uzun sağkalımı göz önüne alındığında, yaşam boyu risk altında oldukları düşünülebilmektedir [67].

Miyeloproliferatif bozuklukların patogeneğinde moleküler genetiğin rolü, MPN'li hastaların önemli bir bölümünde tirozin kinaz *JAK2*'yi kodlayan gende edinilmiş nokta mutasyonunun (Val617Phe) bulunmasıyla ön plana çıkmaktadır [67]. *JAK2* (*Janus Aktive Kinaz 2*) kromozom 9, lokus p24 üzerinde bulunan bir gendir. *JAK2*'nin V617F mutasyonu ilk olarak 2005'te rapor edilmiştir ve tahminen %50 ila %60'lık bir sıklık ile ET'de en sık görülen mutasyonu temsil etmektedir [65]. Bu mutasyon, artan, yapıcı *JAK2* tirozin kinaz aktivitesi ve hematopoetik büyüme faktörü yolları yoluyla artan aşağı akış sinyalleşmesi ile ilişkilidir. Sonraki çalışmalar, trombopoetin reseptör geninin (*MPL*) 10. ekzonundaki mutasyonlar ve daha yakın zamanda, *Calreticulin* geninin (*CALR*) 9. ekzonundaki mutasyonlar olmak üzere ET ve PMF'de iki ek anahtar fenotipik driver mutasyonunun tanımlanmasına yol açmaktadır [67]. *MPL* geni, kromozom 1p34 üzerinde bulunmaktadır. *CALR* geni 19p13.2 kromozomunda bulunmaktadır ve bazı araştırmacılara göre trombosit üretimi ile yakından ilişkilidir [65]. *CALR* mutasyonları hastaların dörtte biri ile üçte biri arasında bulunurken *MPL* mutasyonları en az yaygın olanıdır (~%5). Nadir durumlar dışında üç mutasyonun tümü birbirini dışlayan mutasyonlar olarak kabul edilir. Hastaların yaklaşık %10-15'i üç mutasyonun tümü için negatiftir ("üçlü negatif" ET). Genç hastalarda, *JAK2* mutasyonları daha az sıklıkta görülürken, *CALR* mutasyonları yaşlı popülasyona kıyasla biraz daha yaygındır. "Üçlü negatif" ET de genç hastalarda daha sık görülmektedir (örneğin, 40 yaşın altındaki hastalarda %16, 60 yaşından büyük hastalarda %8).

CALR mutasyonları olan ve aynı zamanda "üçlü negatif" vakaları olan hastalar, *JAK2*-V617F mutasyonları olan hastalarla karşılaştırıldığında sürekli olarak daha düşük tromboz oranları gösterirler, bu da riski etkileyen temel faktörün *CALR*'den ziyade bir *JAK2* mutasyonunun varlığının veya yokluğunun olduğunu düşündürmektedir. *JAK2*-V617F'nin protrombotik etkileri, splanknik ven trombozu ve görünüşte normal kan sayımı olan bireylerde mutasyonun tanımlanması ve *JAK2*-V617F bağlamında trombosit, lökosit ve endotel hücre biyolojisinin klinik öncesi çalışmaları ile de desteklenmektedir [67].

Araştırmacılar sonraki çalışmalarda, diğer tekrarlayan mutasyonların prognostik önemini araştırmışlardır. PMF'li hastalarda bulunan 13 mutasyonla karşılaştırıldığında, ET'li hastalarda medyan mutasyonun altını çizmişlerdir. En sık görülen alt klonal mutasyonların *DNMT3A*, *TET2* ve *ASXL1* genlerinde olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, 181 ET hastasından oluşan bir kohortta, %46'sının *TET2* (%13), *ASXL1* (%11), *DNMT3A* (%6), *SF3B1* (%5), *CEBPA* (%4) dahil olmak üzere *TP53*, *SH2B3*, *EZH2* ve *CSF3R*'deki mutasyonlarla (her biri %2) somatik mutasyonlara sahip olduğunu bulmuşlardır. *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2* ve *EZH2*'deki mutasyonların ET'de daha az olumlu sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar yakın zamanda, spesifik mutasyonlarında bulunduğu ET için bir prognostik model önerdiler. Bu mutasyonlardan birinin veya daha fazlasının bulunduğu hastalarda, akut lösemi ve miyelofibroze ilerleme oranının arttığını ve genel sağkalımın daha kötü olduğunu gözlemlemişlerdir [65,67].

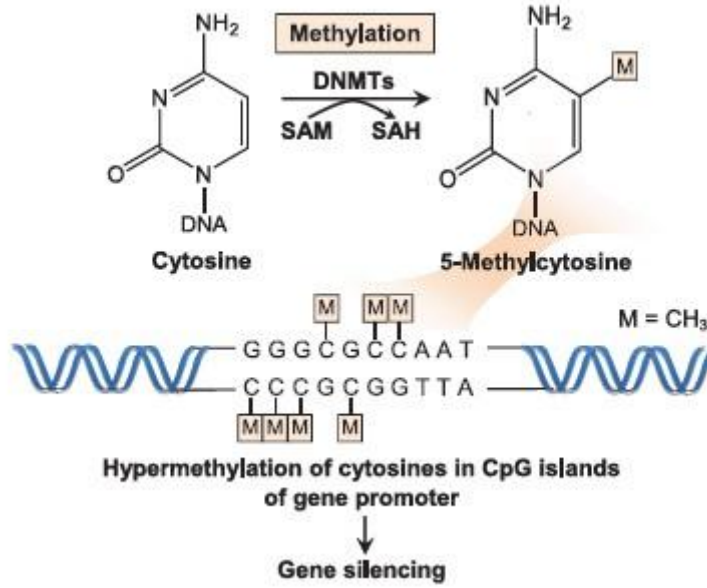
2.7. Epigenetik ve Lösemi

Epigenetik olaylar, DNA dizisinde bir değişiklik olmaksızın gen ifadesindeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik değişiklikler, histon uçlarının post transkripsiyonel modifikasyonları (PTM'ler) ve nükleozom komplekslerinin yeniden şekillenmesi yoluyla kromatini etkilemektedir. DNA, sitozin guanin (CpG) dinükleotitlerinin metilasyonu ile değiştirilebilir. Hem kısa hem de uzun kodlanmayan RNA'lar, epigenetik susturma komplekslerinde yer alır ve ekspresyonları da genlerinin epigenetik modifikasyonu yoluyla doğrudan düzenlenebilir. Genel olarak, epigenetik mekanizmalar; transkripsiyon, DNA onarımı ve replikasyon gibi önemli olaylara katkıda bulunarak 'DNA şablonlu' süreçleri düzenlemektedir [68].

Yeni nesil dizileme analizini kullanan son çalışmalar, sağlıklı bireylerde hematolojik malignite kanıtı olmayan premalign genetik değişiklikleri ortaya çıkarmıştır. Bu değişiklikler, hematolojik malignite geliştirme riskinin artması ve genel sağkalımın azalması ile ilişkili belirsiz potansiyelin klonal hematopoezi (CHIP) olarak adlandırılmıştır. CHIP'li bireylerde bulunan en sık mutasyona uğramış genler, *DNMT3A*, *TET2* ve *ASXL1* olarak belirlenen epigenetik değiştiricilerdir. Özellikle, bu epigenetik değiştiriciler çeşitli miyeloid malignitelerde tekrar tekrar mutasyona uğrar ve bu mutasyonların lösemi gelişiminin erken evresinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Epigenetik değiştiriciler ile normal/malign hematopoez arasındaki fonksiyonel korelasyon, neredeyse on yıldır yoğun bir çalışmanın odak noktası olmuştur. Bu çalışmalar, epigenetik değiştiricilerdeki mutasyonların; hematopoetik kök hücre kendini yenileme/farklılaşma, onkogenlerin/tümör baskılayıcıların transkripsiyonel regülasyonu ve DNA hasar yanıtı dahil olmak üzere lösemogenezde pleiotropik etki uyguladığını göstermiştir [69].

2.8. DNA Metiltransferazlar

Epigenetik modifikasyonlar, DNA metilasyonu, histon deasetilasyonu ve miRNA düzenlemesini içeren DNA'daki kalıtsal değişikliklerdir. Üzerinde en çok çalışılan epigenetik değişiklik DNA metilasyonudur [70]. DNA metilasyonu, 5-metilsitozinin (5-mC) 5-hidroksimetilsitozine (5-hmC) dönüştürülmesi yoluyla DNA'daki kimyasal değişimi düzenlemek için hücreler tarafından benimsenen bir mekanizmayı temsil etmektedir. Birkaç hedef genin promotörünü açar/kapatır, böylece ekspresyon seviyelerini düzenlemektedir ve hastalık fenotipine katkıda bulunmaktadır. DNA metiltransferazlar (DNMT3A, DNMT3B, DNMT1 ve DNMT3L), DNA metilasyonunda yer alan anahtar enzimlerdir [71]. Şekil 2.12'de görüldüğü gibi metilasyon, CpG dinükleotitlerinin spesifik bölgelerindeki sitozin bazlarının beşinci karbon atomunda meydana gelmektedir ve *DNMT*'ler tarafından oluşturulup korunmaktadır [70]. DNMT3A ve DNMT3B proteinleri, metillenmemiş CpG bölgelerinin *de novo* metilasyonu yoluyla embriyogenezin erken dönemlerinde DNA metilasyon kalıplarının oluşturulmasından sorumludur, DNMT1 ise, hemimetillenmiş DNA'yı hedefleyerek ve metil işaretini yeni oluşan DNA zincirine kopyalayarak hücre bölünmesi boyunca bu tür kalıpları korumaktadır. Her üç protein de memeli gelişimi için gereklidir [72]. *De novo* metiltransferazların (DNMT3A / DNMT3B) aşırı ifadesi kanserlerde geniş ölçüde rapor edilmiştir bu da onkogenik bir rol üstlendiklerinin göstergesidir. *DNMT3A* genindeki mutasyonlar sıklıkla lösemogenez sırasında erken olaylar olarak ortaya çıkan çeşitli yetişkin hematolojik malignitelerde tespit edilmiştir [72].

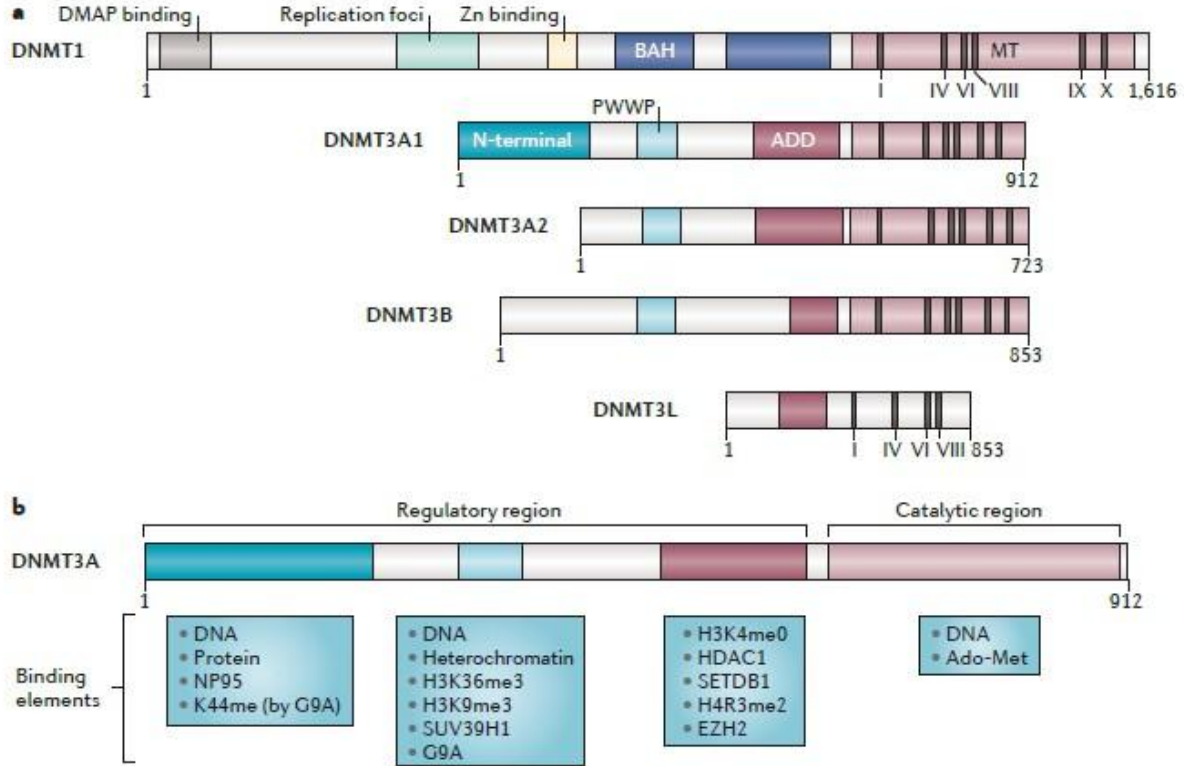


Şekil 2.12: DNMT'ler, bir metil grubunun metil donörü S-adenozilmetiyoninden (SAM) gen promotörünün CpG adalarındaki sitozin bazının beşinci karbonuna transferini katalize eder. SAM, katalitik reaksiyonda S-adenozilhomosisteine (SAH) dönüştürülür. Sitozinlerin hipermetilasyonu, genin transkripsiyonunu baskılar [70].

2.8.1. DNA Metiltransferaz-3A (DNMT3A) ve Yapısı

DNMT3A, insanlar ve fareler arasında %98 homoloji ile omurgalılarda yüksek oranda korunan 130 kDa'lık bir proteindir. İnsan kromozomu 2p23 üzerindeki 23 ekzon tarafından kodlanmaktadır ve DNMT3A1 (fare embriyonik kök (mES) hücrelerinde baskın ekspresyonu nedeniyle çoğu çalışmanın konusu olan uzun bir izoform) ve DNMT3A2 (kısa bir izoform) olmak üzere iki ana formda ifade edilmektedir (şekil 2.13a). Uzun izoform ayrıca, amino ucunda proteinin DNA bağlanma afinitesini ve metilasyon aktivitesini in vitro olarak arttırdığı gösterilen 219 amino asit içermektedir. DNMT3A2'nin, ifadesi germ hücreleri ve erken embriyogenez ile sınırlı olan metiltransferaz ailesinin katalitik olarak aktif olmayan bir üyesi olan DNMT3L ile etkileşime girdiği belirtilmektedir. Bu etkileşimin herhangi bir proteinin kaybı yoluyla bozulması, imprinting ve spermatogenezde kusurlara yol açmaktadır [72,73].

DNMT3A, Pro-Trp-Trp-Pro (PWWP) alanı, ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) alanı ve S-adenozil metiyonin (SAM)-bağımlı metiltransferaz C5 tipi alanı olmak üzere üç etki alanı içermektedir. PWWP alanı, gen gövdelerinde DNA ve spesifik histon işaretlerini sinerjistik olarak bağlamaktadır. ADD alanı, H3 kuyruk peptitlerini bağlamaktadır. SAM-bağımlı metiltransferaz C5 tipi alanı ise, yüksek oranda korunmuş metiltransferaz (MTase) alanını kodlayarak (Şekil 2.13a [73]) sonrasında, DNA'yı tanıyan ve bağlayan ve kofaktör SAM'ı bağladıktan sonra sitozinin C5 pozisyonuna bir metil grubunu bağlamaktadır.



Şekil 2.13: DNA metiltransferaz proteinlerinin yapısı ve bağlayıcı ortakları [73].

Şekil 2.13b'de görüldüğü gibi DNMT3A, uzun izoforma özgü olan ve DNA bağlama yeteneği sergileyen bir amino terminal alanı içermektedir. Ayrıca embriyonik kök hücrelerde *OCT3* (*OCT4* ve *POU5F1* olarak da bilinir) gibi transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girebilmektedir. N-terminal alanını lizin 44 (K44), G9A tarafından dimetillenir ve G9A ve/veya EHMT1 (GLP olarak da bilinir) ile etkileşimler için önemlidir; bu etkileşim, embriyonik kök hücre pluripotensi ile ilgili olan *OCT3* promotörü gibi bazı lokusların DNA metilasyonu için gereklidir. PWWP, DNA ve heterokromatin bağlanmasının yanı sıra histon H3 lizin 36 trimetilasyonu (H3K36me3) ve H3K9me3 işaretleri ile etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli yeteneklere sahiptir. ADD alanı, histon deasetilaz 1 (HDAC1) ve modifiye edilmemiş H3K4 için güçlü bir afiniteye sahiptir ve DNA metiltransferaz aktivitesini olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir. Bu alan, modifiye edilmemiş histon H3 bağlanmasının varlığında bir inhibisyon döngüsü olarak hareket etmek için metiltransferaz alanına bağlanmaktadır. Aynı zamanda histon-lizin N- metiltransferaz SUV39H1 gibi gen baskılanmasında yer alan histon değiştiricilerle de etkileşime girmektedir. Ayrıca, ADD alanı, zeste homologu 2'nin (EZH2) histon-lizin N- metiltransferaz güçlendiricisine bağlanmaktadır. EZH2, H3K27 metilasyonundan sorumlu olan Polycomb baskılayıcı kompleks 2'nin (PRC) bir parçasıdır [73].

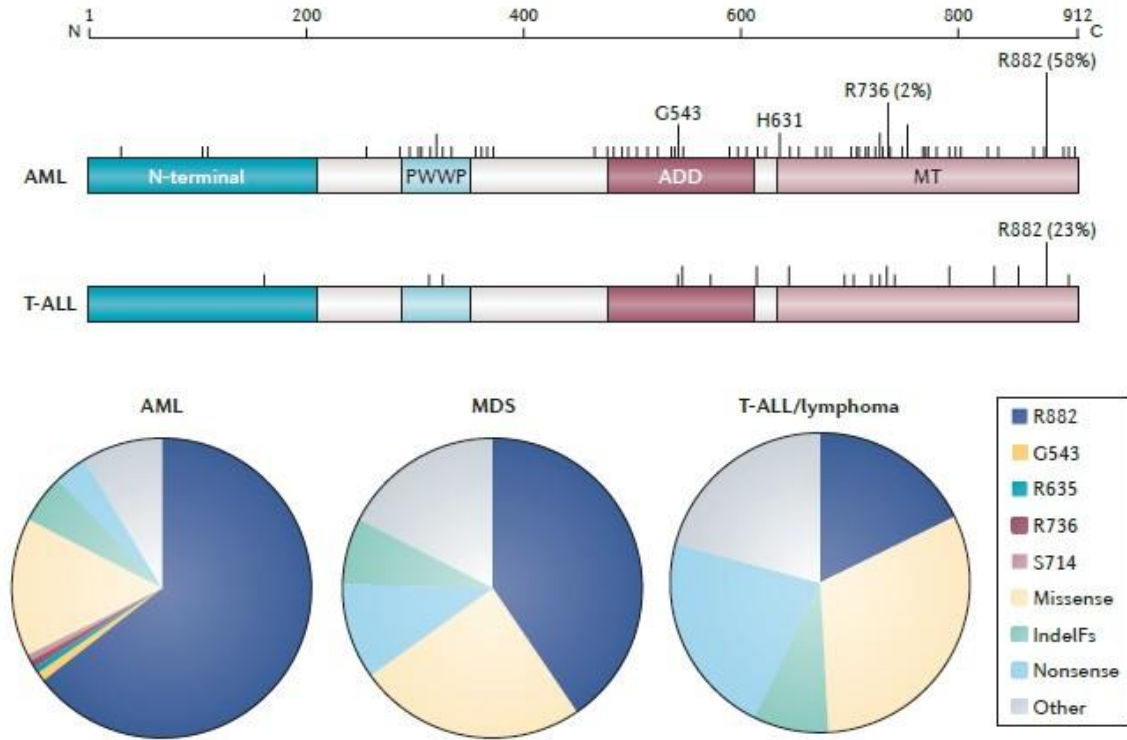
DNMT3A'daki üç ana alanın her birinin belirli epigenetik işaretlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda *DNMT3A* için bir mekanizması gösterilmektedir, bu mekanizmada ADD alanının, MTase alanını fiziksel olarak bloke ettiği söylenmektedir. Benzer şekilde, PWWP alanı, DNA'yı ve trimetillenmiş histon H3 lizin 36'yı (H3K36me3) bağlamaktadır. H3K36me3, aktif kromatini işaretler ve perisentromerik DNA dahil olmak üzere gen gövdeleri ve tekrarlayan elementler açısından oldukça zengindir. Gerçekten de, *DNMT3A* perisentromik heterokromatik odaklarla aynı yerde bulunur ve EK hücrelerinde PWWP alanının bozulması, *DNMT3A*'nın yaygın bir nükleer modellenmesine ve perisentrik heterokromatinde ana uydu tekrarlarında metilasyon aktivitesinin kaybına yol açmaktadır.

Gametogenez ve erken embriyogenez sırasında, tekrarlayan elementlerin baskılanması yoluyla germ hattının korunması çok önemlidir; bu bastırma, embriyonik gelişim sırasında PWWP alanının önemli bir işlevini temsil edebilmektedir [72].

Son olarak, *DNMT3A*'nın MTase alanının, tercihen metillenmemiş DNA'yı bağladığı gösterilmiştir. İn vitro deneyler, bazı CpG yan bazlarının, özellikle AT açısından zengin dizilerin, metillenmiş CpG'lerde zenginleştirilmiş dizi motifleri hakkında genom çapında verilerle tutarlı olarak, metilasyon aktivitesini birkaç büyüklük sırası ile artırabildiğini göstermiştir. *DNMT3A*'daki somatik mutasyonların çoğu heterozigottur ve üç ana alanın her birinde *de novo* germ hattı mutasyonları meydana gelebilmektedir [72].

Çekirdekte, *DNMT3A*, MTase alanındaki iki farklı bağlanma arayüzü yoluyla dimerler, tetramerler ve daha büyük yapılar olarak oligomerik biçimde bulunabilmektedir. Oligomerler, homodimerik *DNMT3A* moleküllerinden veya heterodimerik *DNMT3A*–*DNMT3L* moleküllerinden oluşmaktadır, bununla birlikte, *DNMT3L*'de tek bir bağlanma arayüzünün varlığı, bir 3L-3A-3A-3L tetramer durumundan sonra daha fazla oligomerizasyonu önlemektedir. Tetramerin yapısı, ortalama yaklaşık 9 bp'lik bir mesafede iki bağımsız CpG bölgesinin koordineli metilasyonuna izin vermektedir. Önemli olarak, *DNMT3A*'nın hem DNA hem de SAM bağlanma afinitesinin yanı sıra enzimin işlenebilirliği, *DNMT3A*'nın oligomerik durumuna bağlıdır. Araştırmacılar, *DNMT3L* ifadesi ve diferansiyel *DNMT3A/3B* izoformu kullanımındaki gelişimsel değişikliklere ek olarak, *DNMT3A* bağlanma arayüzlerindeki mutasyonları içeren bir dizi patolojik değişikliğin, oligomerizasyonu etkilediği ve hücre davranışını değiştirdiğini göstermişlerdir [72].

Çeşitli miyeloid ve lenfoid neoplazmalarda *DNMT3A* gen mutasyonları tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, *DNMT3A* gen mutasyonları, pediatrik kan kanserlerinde çok nadir görünmektedir ve ergenlerde tespit edilen birkaç mutasyon bulunmaktadır. Hematopoetik bozukluklarda bulunan *DNMT3A* gen mutasyonlarının çoğu, kodon R882'deki mutasyonlar için önemli bir metiltransferaz alanı (MTD) içinde meydana gelmektedir (Şekil 2.14). Bununla birlikte, ana alanların her birinde R882 olmayan missense ve truncating mutasyonlar bulunmaktadır [73]. AML ve diğer miyeloid neoplazmlarda, R882 mutasyonları genellikle heterozigottur. Bununla birlikte, T hücreli akut lenfoblastik lösemide (T-ALL), miyeloid ve lenfoid bozukluklarda *DNMT3A* mutasyonları üzerinde farklı seçici baskılar olduğunu düşündüren yüksek bir R882 dışı biallelik mutasyon sıklığı rapor edilmiştir. Bu veriler ek mutasyonlarla birlikte ele alındığında, *DNMT3A*'nın miyeloid lösemilerde haplo yetersiz bir tümör baskılayıcı gen olduğunu göstermektedir [72].



Şekil 2.14: Miyeloid ve lenfoid lösemide DNMT3A mutasyon sıklığının dağılımı [73].

DNMT ifadesinin düzenlenmesindeki en önemli bulgulardan biri miR-29b aracılı baskılamadır. Araştırmacılar, miR-29b'nin 3' UTR'lerinde *DNMT3A* ve *DNMT3B*'yi doğrudan hedeflediğini, *DNMT1* ifadesinin bir transaktivatörü SP1'i hedefleyerek dolaylı olarak *DNMT1*'i aşağı regüle ettiğini göstermiştir [70].

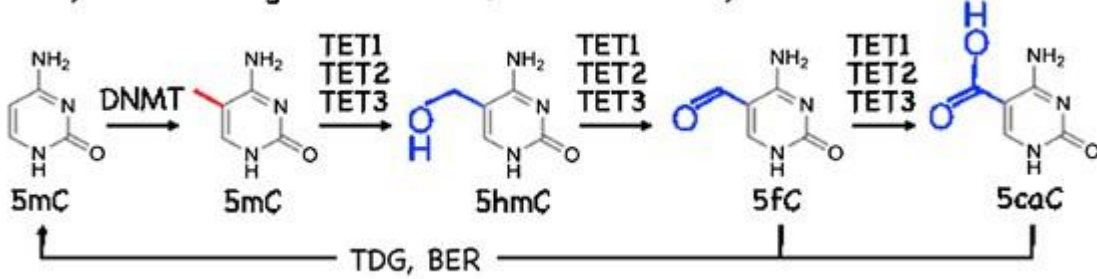
2.8.2. Ten-Eleven Translokasyon (TET) Ailesi

5mC'nin kalıcı olarak kalıtılan bir epigenetik modifikasyon olduğu uzun zamandır kabul edilmektedir. Bununla birlikte, genomdaki bir 5mC alt kümesi, epigenetik olarak kararsızdır ve enzimatik olarak daha fazla değiştirilebilmektedir. TET enzim fonksiyonunun analizleri, DNA'daki sitozinin, daha önce inanıldığı gibi ikili bir modifikasyon durumunda (C'ye karşı 5mC) mevcut olmadığını, ancak farklı durumlarında söz konusu olabileceğini ortaya koymaktadır [74].

Şekil 2.15'te görüldüğü gibi bir TET dioksijenaz, 5-mC'den 5-hmC'ye dönüşümü katalize ettiğinde, bunu çok aşamalı biyokimyasal reaksiyonlar takip etmektedir ve pozisyon en sonunda değiştirilmemiş sitozin (uC) ile değiştirilmektedir [75]. İlk TET ailesi üyesi, *TET1/LCX*, başlangıçta bebek AML'sinde bulunan kromozomal translokasyonun t(10;11)(q22;q23) kırılma noktasından *MLL* geninin bir füzyon ortağı olarak klonlanmıştır [76]. Araştırmacılar, *Ten-Eleven Translokasyon-1 (TET1)* geninin, bir oksijen atomunu 5-mC'lik metil grubuna transfer ederek 5-mC'yi 5hmC'ye dönüştüren bir dioksijenazı kodladığını göstermiştir. Bu keşif, demetilasyon süreçlerinin altında yatan mekanizmaları anlamada hızlı ilerleme sağlamıştır [75]. *TET1*'in homoloji araştırmaları daha sonra iki ek aile üyesinin, *TET2* ve *TET3*'ün keşfedilmesine yol açmıştır ve yapılan analizlerle TET ailesi üyeleri arasında ortak

özelliklerin olduğunu, *TET2* ve *TET3* genlerinin *TET1* geni ile benzer dioksijenaz fonksiyonları sergilediğini bulmuş oldular [75,76].

Enzyme converting 5mC to 5hmC, and further oxydization



Şekil 2.15: TET enzimi 5mC'ni 5hmC'ne dönüştürmektedir. 5hmC ayrıca timin DNA glikosilaz (TDG) ve baz eksizyon onarımı (BER) ile demetilasyon yoluna giren 5-formil sitozin (5-fC) ve 5-karboksil sitozin (5caC)'ye oksitlenmektedir. 5hmC ayrıca bir epigenetik işaret olarak da işlev görmektedir [75].

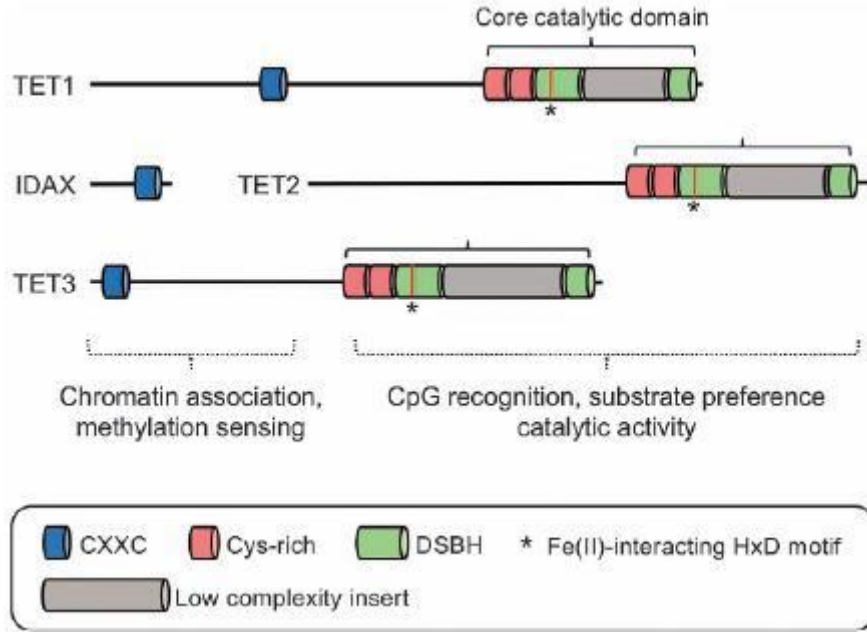
Araştırmacılar sonraki çalışmalarla, üç TET proteininin tamamının bir dioksijenaz enzimi ailesine ait olduğunu göstermiştir. TET ailesi 5mC'lik metil grubunu art arda oksitlemek için aynı katalitik aktiviteyi paylaşmaktadır. 5-hidroksimetilsitozin (5hmC), 5-formilsitozin (5fC) ve 5-karboksilsitozin (5caC) olmak üzere üç farklı oksitlenmiş metilsitozin formu olduğunu göstermişlerdir [74].

2.8.2.1. *TET2* Geni

TET enzim ailesinin bir üyesi olan *TET2* geni, kromozom 4q24 üzerinde bulunmaktadır ve protein ürünü olan TET2, DNA demetilasyonunu desteklemek için 5-mC'yi 5-hmC'ye dönüştürerek DNA hidroksimetilasyonunu modüle etmektedir [77]. *TET2* gen mutasyonlarının; hematopoetik malignitelerde, özellikle miyeloid maligniteler için, potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak önerilen 5hmC'deki bir azalma ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [77].

TET proteinleri, korunmuş bir sistein açısından zengin alan ve bir çift sarmallı β -sarmal alanı (DSBH) içeren bir karboksil-terminal çekirdek katalitik alanı içermektedir (Şekil 2.16). DSBH alanı içinde Fe(II) ve 2-oksooglutarat (2OG) ile etkileşime giren anahtar katalitik kalıntılar bulunmaktadır. Kofaktör bağlanması üzerine moleküler oksijen, katalitik alanda Fe(II)'yi oksitlemektedir, böylece 2OG'nin oksidatif dekarboksilasyonunu ve substrat oksidasyonunu indüklemektedir. DSBH katalitik alanının dış yüzeyinde büyük bir ek alan bulunmaktadır. Bu yerleştirmenin kesin işlevi henüz belirlenmemiş olsa da, glikozilasyon ve fosforilasyon gibi transasyon sonrası modifikasyonlar yoluyla düzenleyici rollere sahip olabileceği düşünülmektedir. Bir çalışma, bu ek alanın silinmesinin, *TET2* katalitik alanı tarafından 5hmC üretimini belirgin şekilde arttırdığını göstermektedir. TET proteinleri ayrıca kromatin hedeflemelerini potansiyel olarak düzenleyen ek bir alana sahiptir. Amino terminal bölgesinde, TET1 ve TET3, iki Cys4 tipi çinko parmak motifinden oluşan CXXC alanı adı verilen bir DNA bağlama alanına sahiptir [74]. İlginç bir şekilde, TET2'nin CXXC tipi bir etki alanı yoktur. TET2'nin CXXC tipi domaininin evrim sırasında bir kromozomal inversiyona uğradığı söylenmektedir. Sonuç olarak, CXXC alanını kodlayan segmentin, katalitik alanı kodlayan bölgeden ayrıldığı, bu nedenle, ters yönde *TET2* geninin 5'-ucunda yer alan *IDAX* adı verilen bağımsız, CXXC içeren bir gen haline geldiği varsayılmaktadır.

IDAX'ın, doğrudan bağlanma yoluyla bozulmasını kolaylaştırarak TET2 aktivitesini negatif olarak düzenlediği öne sürülmektedir. (şekil 2.16) [74,76].



Şekil 2.16: TET proteinlerinin etki alanı yapısı [74].

TET proteinlerinin CXXC alanı (TET2 durumunda *IDAX* CXXC alanı) yüksek oranda korunmaktadır ve tercihen metillenmemiş CpG içeren dizilerle birleşmektedir. CXXC alanının varlığı veya yokluğu, TET proteinlerinin genomik dağılımını etkileyebilmektedir. TET1 tercihen fare EKH'lerindeki promotör CpG adalarında (CGI'ler) veya geliştiricilerde, özellikle CpG adalarında saptanırken, TET2 çoğunlukla gen gövdelerinde veya güçlendirici bölgelerde zengindir [74].

Araştırmacılar, *TET2* ile etkileşime giren proteinleri, *TET2* ifade edilerek ve ardından kütle spektrometrisi ile birleştirilmiş afinite saflaştırması yaparak tanımlayıp analiz etmişlerdir. Bilinen *TET2* ile etkileşime girenlerin, küçük moleküller, mikro-RNA'lar ve bazı transkripsiyon faktörleri olduğunu gözlemlemişlerdir. *TET2*, enzimatik aktivitesinden bağımsız bir etki olan O-bağlı beta-D-N-asetilglukozamin (O-GlcNAc) transferazı (OGT) kromatine alabilmektedir. *TET2* ve OGT, kromatin üzerinde birlikte yerleşir. Gen transkripsiyonunu düzenleyerek H3K4me3 seviyesini artırır. Ek olarak, çok sayıda çalışma, mikroRNA'ların (miR-7, miR-22, miR-26, miR-29, miR-101, miR-125) mRNA öncesi seviyede *TET2* gen ifadesini negatif olarak düzenlediğini doğrulamıştır [77].

TET2, kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini ve soy bağılılığını ve monositlerin terminal farklılaşmasını teşvik etmek de dahil olmak üzere, hematopoezde önemli roller oynamaktadır. *TET2*, hematopoetik kök/progenitör hücrelerde yüksek oranda ifade edilir ve birincil kemik iliği hücrelerinde *TET2*'nin delesyonu, olgunlaşmamış c-Kit+Lin- hücrelerinin yüzdesinin artmasına yol açmaktadır, bu da *TET2* kaybının kök/progenitör hücre farklılaşmasını etkileyebileceğini düşündürmektedir. CD34+ CD38+ hücrelerinde *TET2* delesyonu, monosit klonalitesi destekleyebilir, bu da *TET2*'nin düzenleyici bir rolü olduğunu göstermektedir [77].

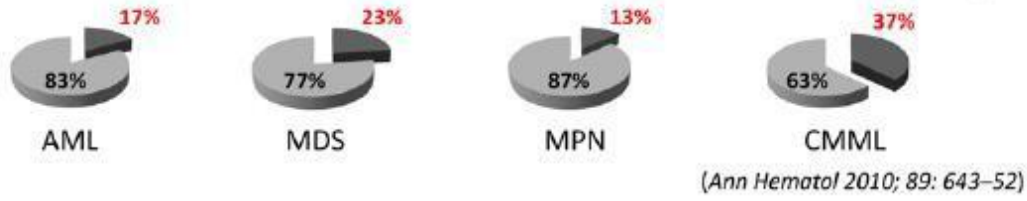
TET proteinlerinin yapısal analizleri, TET enzimlerinin substratlarını nasıl tanıdığına ve oksidasyon reaksiyonlarını nasıl katalize ettiğine dair önemli bilgiler sağlamaktadır. *TET2* katalitik çekirdek alanının kristal yapısı, Cys açısından zengin alanın, DNA'nın bulunduğu DSBH alanı etrafına sarıldığını ortaya çıkarmıştır. Cys açısından zengin ve DSBH alanlarından birkaç kalıntı tarafından koordine edilen üç çinko parçadan ikisi, kompakt bir küresel yapının oluşumunu kolaylaştırmak için iki alanı birbirine yaklaştırarak DNA substrat tanıma için benzersiz bir yapı oluşturmaktadır. *TET2*, 5hmC'nin genom boyunca neredeyse sadece CpG bağlamında yer almasıyla tutarlı olarak, yan diziler için herhangi bir tercih olmaksızın 5mCpG içeren DNA'ları spesifik olarak tanımaktadır. Bu etkileşim, DNA omurgasındaki *TET2* ve 5mCpGs-yan fosfatların anahtar kalıntıları arasındaki geniş moleküller arası hidrojen bağları ile stabilize edilmektedir. Bazların üst üste gelerek etkileşimlerinden kaynaklanan hidrofobik etkileşimler de yapının genel stabilitesine katkıda bulunmaktadır. İlginç bir şekilde, CpG tanıma 5mC'nin metil grubuna bağlı değildir. Buna göre, TET proteinleri, aktif bölgede yüksek oranda oksitlenmiş 5mC türevlerinin formil ve karboksil gruplarını barındırabilmektedir [74].

Oksi-mC'lerin çoğu 5mC'nin aksine, belirli bir CpG alanında asimetrik olarak birikmektedir. Bu iplik asimetrisinin moleküler temeli nedir? DNMT enzimlerinin SRA alanının 5mC'yi tanıdığı gözlemlenmiştir. *TET2* ise bir baz çevirme mekanizması kullanarak oksi-mC'leri tanımaktadır. *TET2*'nin simetrik olarak metillenmiş palindromik CpG DNA'sına bağlanması üzerine, bir iplikte sadece tek bir oksitlenmiş baz, DNA dupleksinden dışarı çevrilerek aktif bölgeye dahil edilmektedir [74].

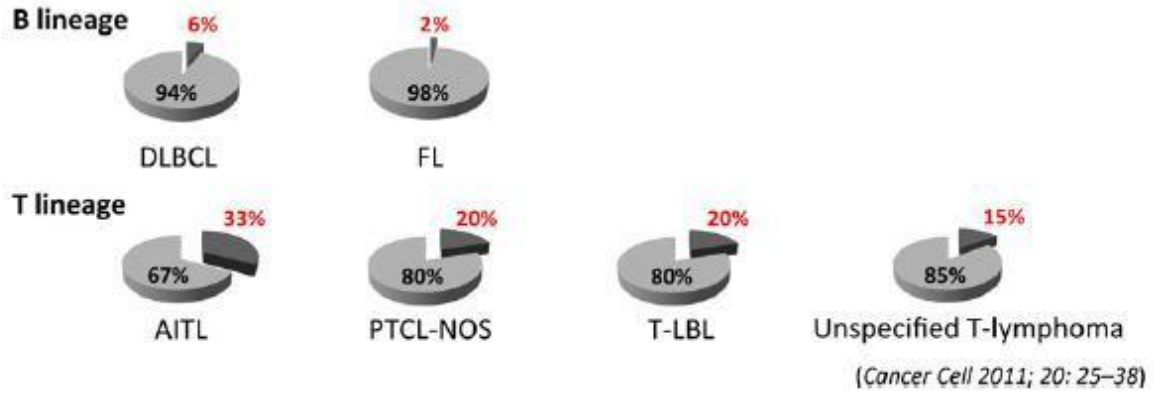
TET2, yaygın olarak bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmiştir. *TET2* delesyonu, farelerde miyeloid ve lenfoid malignitelere neden olmak için yeterlidir. *TET2* genindeki homozigot ve heterozigot mutasyonlar, insan hematopoetik malignitelerinde tekrarlayan olaylardır [77]. Somatik *TET2* gen mutasyonları, çok çeşitli hematolojik malignitelerde sıklıkla tanımlanmaktadır. Bu mutasyonlar, *TET2* dioksijenazın enzimatik aktivitesinin bozulmasına neden olarak 5-mC'den 5-hmC'ye dönüşümünün yani, demetilasyonun başarısız olmasına neden olmaktadır. *TET2* mutasyonu taşıyan hücrelerdeki anormal 5-mC/5-hmC/uC paterninin, hedef genlerin ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu ve sonunda hücreleri hematolojik malignite geliştirmeye yönlendirdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, *TET2* mutasyonlarının genom boyunca CpG bölgelerinde sitozinin metil grubu modifikasyon şemasını nasıl değiştirdiği ve bu tür yapısal değişikliklerin gen ekspresyon profillerini nasıl etkilediği belirsizliğini korumaktadır [75].

Hematolojik malignitelerde *TET2*'nin tekrarlayan mutasyonu ilk olarak kromozom 4q24 anormallikleri olan MDS hastalarında rapor edilmiştir. *TET2*, MDS hastalarının kromozom 4q24'ünde tek ebeveynli dizomiden veya yaygın olarak silinen bir bölgeden tanımlanmıştır ve MDS hastalarının yaklaşık %26'sının *TET2*'nin kodlama bölgesinde mutasyonlar (silmeler veya yanlış anlamlı / anlamsız mutasyonlar) barındırdığı gösterilmiştir. Başka bir araştırma grubu, AML, MDS veya miyeloproliferatif neoplazmalı hastalarda *TET2* geninin mutasyonlarını veya delesyonlarını da bildirerek, hastalığın başlaması için nedensel rollerini ortaya koymuştur. Daha sonraki çalışmalar, *TET2*'nin KMML ve malign lenfoma dahil olmak üzere çok çeşitli hematolojik malignitelerde mutasyona uğradığını göstermiştir [76]. Bu mutasyonların sıklığı miyeloid ve lenfoid neoplazmalarda; MDS %20-35, MPN'de ~%13, KMML %30-60, AML'de ve %12-34'tür. Lenfoid malignitelerde ise bu oran %2-33 arasındadır. Şekil 2.17'de, *TET2*'nin maligniteler arasındaki görülme sıklığı görülmektedir. [75,77,78].

Myeloid malignancies



Lymphoid malignancies

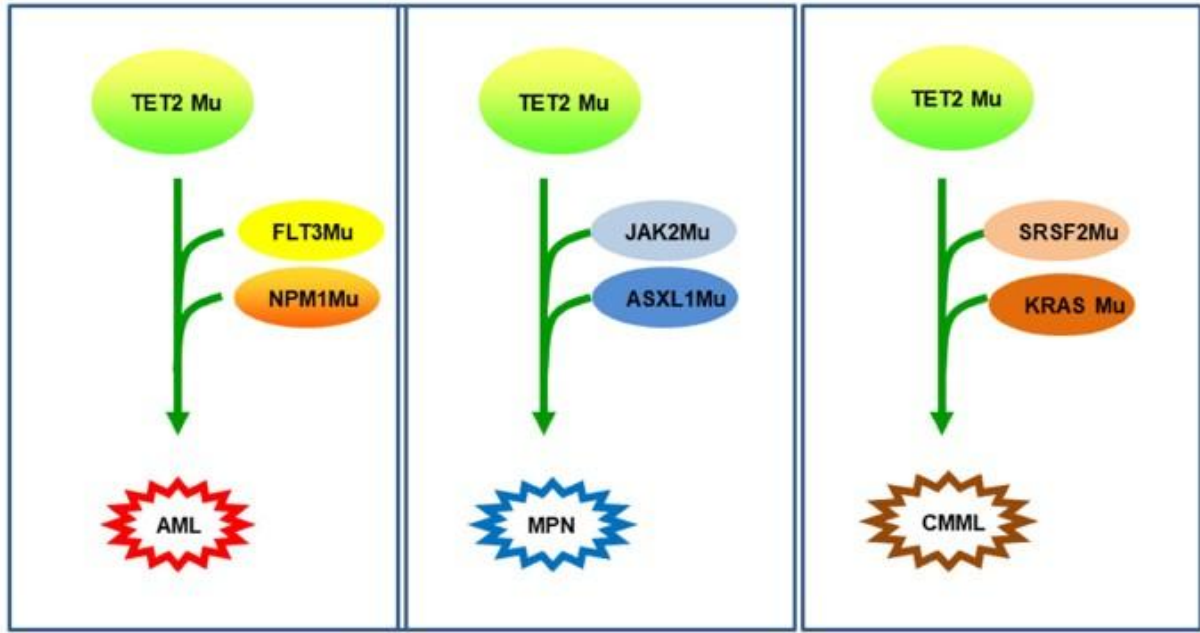


Şekil 2.17: Çeşitli hematolojik malignitelerde TET2 mutasyonunun sıklığı. AITL, anjiyoimmünoblastik T hücreli lenfoma; AML, akut miyeloid lösemi; KMML, kronik miyelomonositik lösemi; DLBCL, diffüz büyük B hücreli lenfoma; FL, foliküler lenfoma; MDS, miyelodisplastik sendrom; MPN, miyeloproliferatif neoplazm; PTCLNOS, periferik T hücreli lenfoma, başka türlü tanımlanmamış; T-LBL, T-lenfoblastik lenfoma [76].

Bu miyeloid malignitelerden *TET2* gen mutasyonlarının en sık KMML ve MDS’de görüldüğü söylenmektedir. AML’de *TET2* gen mutasyonları, ikincil vakalarda *de novo* vakalara göre daha sık görülmektedir. Bu mutasyonlar, kodlama bölgesi boyunca frame-shift mutasyonları ve nonsense mutasyonlar veya enzimatik aktivite için gerekli fonksiyonel alanlara lokalize olan missense mutasyonlardır. *TET2*-DNA kompleksinin kristal yapısı, bölgedeki missense mutasyonların *TET2*’nin katalitik aktivitesi için gerçekten önemli olduğunu ortaya koymaktadır [75]. *TET2* gen mutasyonlarının çoğu heterozigottur, ancak kromozom 4q24’ün uniparental dizomisinde bazı mutasyonların çift heterozigot veya homozigot olduğu belirtilmektedir [76].

TET2 gen mutasyonlu miyeloid malignitelerin prognozu söz konusu olduğunda, *TET2* mutasyonlarının etkisi tartışmalıdır. Büyük kohort çalışmaları, *TET2* gen mutasyonlarının AML ve MPN hastalarında genel sağkalımları etkilemediğini göstermiştir. Bazı raporlar ise, *TET2* mutantı KMML ve AML hastalarının, *TET2* gen mutasyonları olmayan hastalarla karşılaştırıldığında daha kötü sonuçlara sahip olduğunu göstermiştir [77].

TET2 gen mutasyonları, patogeneizde erken bir olay olarak, çeşitli hematolojik maligniteleri teşvik etmek için arka plan mutasyonları olarak kabul edilen diğer gen mutasyonlarıyla birlikte görülebilmektedir. Örneğin, şekil 2.19’da görüldüğü gibi; *FLT3-ITD* mutasyonunu barındırırken *TET2* gen mutasyonları, AML’yi indüklediği; *TET2* gen mutasyonları, *JAK2* ve *ASXL1* mutasyonu ile birlikte görülürse, PV ve sekonder miyelofibroz gibi MPN’ye neden olduğu; son olarak, *TET2* gen mutasyonları, *SRSF2* ve *KRAS*’taki mutasyonlarla birlikte KMML’ye sebep olduğu gösterilmiştir [77].



Şekil 2.18: Arka plan mutasyonları olarak *TET2* mutasyonları [77].

Daha yakın zamanlarda, belirsiz potansiyel klonal hematopoezi olan yaşlı bireylerde, yani tanımlanmış hematolojik hastalığı olmayan klonal hematopoezi olan bireylerde *TET2* gen mutasyonları tespit edilmiştir. Bu, *TET2* gen mutasyonlarının tek başına lösemogenezi sürdüremeyeceğini ve ek olayların muhtemelen katkıda bulunduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, insan hematolojik hastalıklarında *TET1* ve *TET3* mutasyonları nadirdir [78]. Son olarak, *DNMT3A*'dan sonra, *TET2* geni klonal hematopoezde en sık mutasyona uğrayan ikinci veya üçüncü gendir. Bu, *TET2* gen mutasyonunun kendi başına hematolojik maligniteleri indüklediğini, bunun yerine bunu diğer driver mutasyonlarıyla birlikte yaptığını göstermektedir [75].

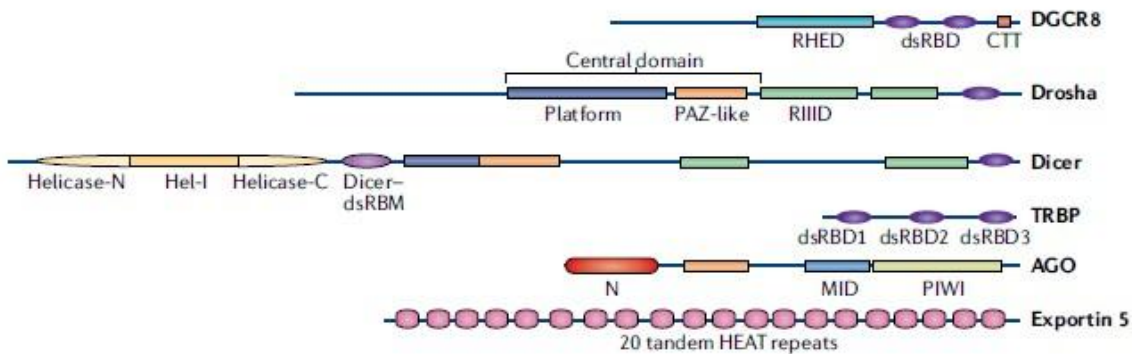
Son zamanlarda, *TET2*'nin bağışıklık sisteminin düzenlenmesine de katıldığı bildirilmiştir. *TET2*, diğer TET ailesi genleriyle karşılaştırıldığında her T yardımcı hücre (Th hücresi) alt kümesinde yüksek oranda eksprese edilir. *TET2*^{-/-} T hücreleri, hem mRNA hem de protein seviyesinde IFN- γ ve IL-10 üretiminde belirgin bir azalma göstermektedir, bu da azalmış p300 alımı ile ilişkilendirilmiştir ve bu, *TET2*'nin Th1 ve Th17 hücre farklılaşmasını düzenleyebileceğini düşündürmüştür [77].

2.8.3. MikroRNA (miRNA)

MiRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen ifadesini susturan yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda olan, küçük kodlanmayan RNA'lardır. *C. elegans*'ta ilk miRNA'nın keşfedilmesinden bu yana, küçük düzenleyici RNA'lara olan ilgi giderek artmıştır, bu da sineklerde, nematodlarda ve insanlarda binlerce miRNA'nın keşfedilmesiyle sonuçlanmıştır. Birçok farklı organizmada yapılan çalışmalar, tüm gelişimsel ve biyolojik süreçlerde yer alan genlerin ifadesini düzenlemede miRNA'ların rollerini açığa çıkarmıştır [79].

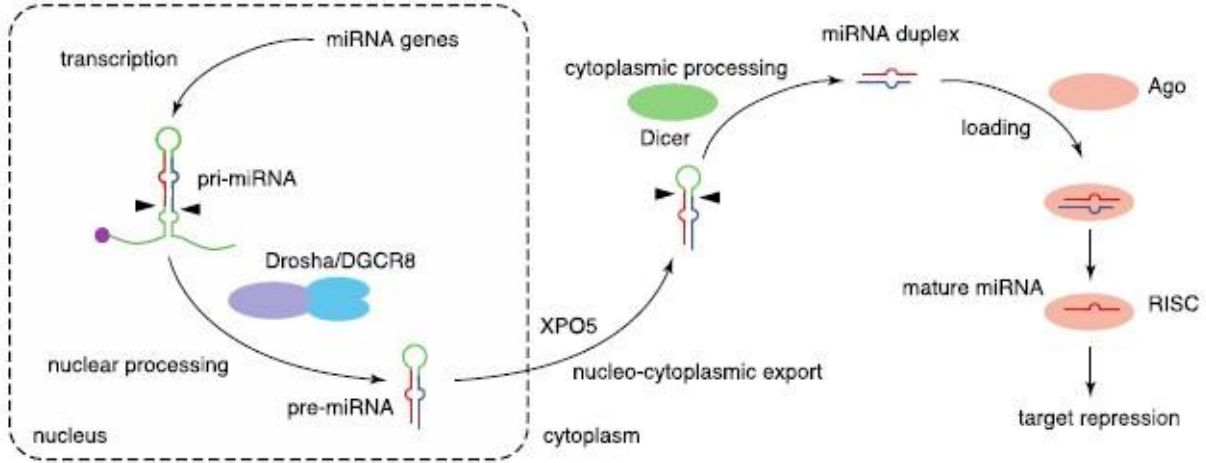
miRNA'nın biyogeneze birden fazla adım aracılık eder (şekil 2.19 [80]). Bunlar;

- Birincil miRNA transkriptlerinin transkripsiyonu,
- Drosha tarafından nükleer işleme,
- Nükleositol plazmik dışı aktarma,
- Dicer tarafından sitoplazmik işleme ve
- Argonaute (Ago) proteinleri ile RNA kaynaklı susturma kompleksinin (RISC) oluşumudur [81].



Şekil 2.19: miRNA biyogenez faktörlerinin alanı [80].

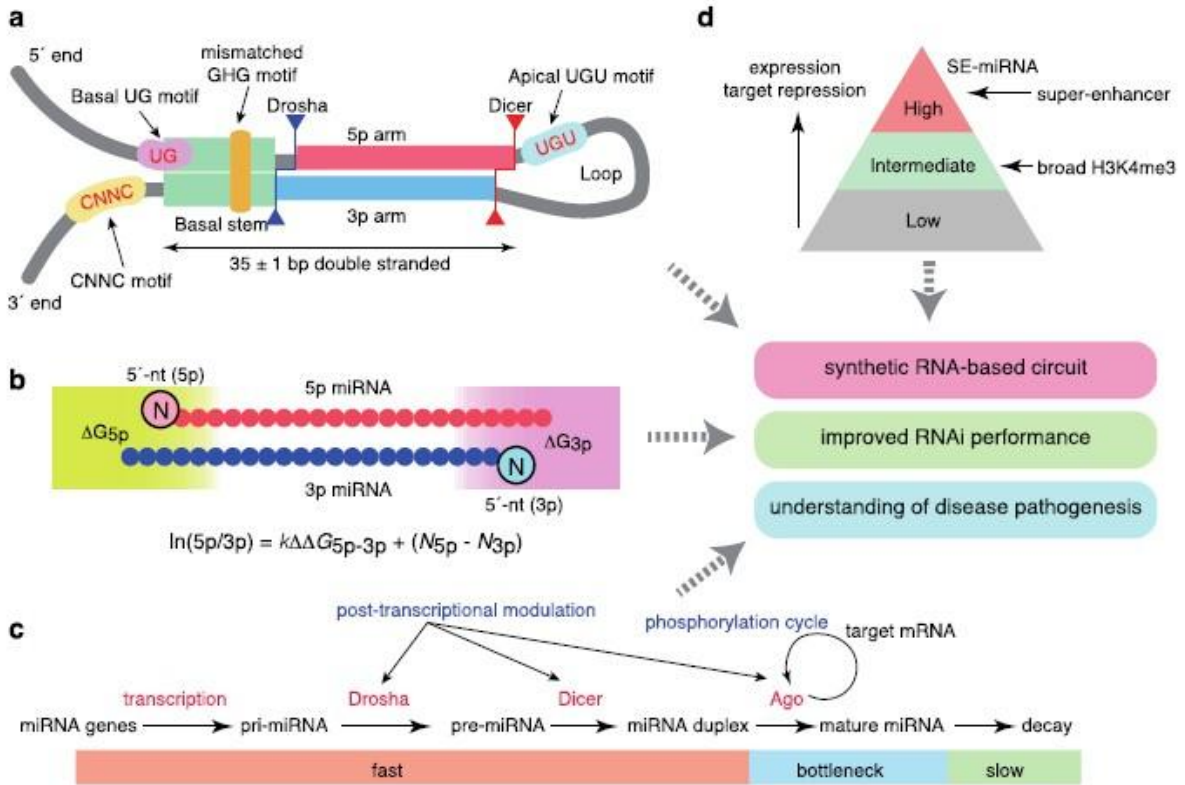
Kanonik miRNA'ların biyogenezisi, esas olarak RNA polimeraz II tarafından uzun birincil miRNA transkriptlerinin (pri-miRNA'lar) üretilmesiyle başlamaktadır. Bu miRNA'lar, bireysel miRNA genleri (monosistronik), miRNA kümeleri (polisistronik) veya protein kodlayan genlerin intronları (intronik) olarak kodlanmaktadır. Pri-miRNA'lar, çekirdekteki Drosha kompleksi tarafından öncü miRNA'lar (pre-miRNA'lar) olarak adlandırılan saç tokası yapısına sahip RNA'lara işlenmektedir. Bu Drosha kompleksi, RNase III, Drosha ve çift sarmallı RNA (dsRNA) bağlayıcı protein, DiGeorge sendromu kritik bölge 8'den (DGCR8) ve çeşitli ortak proteinlerden oluşmaktadır. Drosha işleminin ardından pre-miRNA'lar exportin-5 (XPO5) ile sitoplazmaya aktarılmaktadır. Pre-miRNA'lar sitoplazmada RNase III, Dicer tarafından işlenir ve 21-24 nt miRNA dupleksini serbest bırakır. TRBP, PACT ve ADAR1 dahil olmak üzere Dicer ile ilişkili birkaç protein bilinmektedir [81]. miRNA dupleksi daha sonra RISC oluşturmak için HSP70/HSP90 şaperonların yardımıyla bir Ago proteinine yüklenir. Ago proteini (Ago1-4) arasında sadece Ago2, küçük interferans yapan RNA (siRNA) mekanizmasında hedef mRNA bölünmesini sağlayan güçlü bir slicer aktiviteye sahiptir; diğerlerinin slicer etkinliği yoktur veya slicer etkinliğini ortaya çıkarmak için karmaşık bazı özellikleri bulunmaktadır. İki miRNA dupleks dizisinden, Ago proteinlerinde tutulan kılavuz iplik (miRNA olarak bilinir) olarak adlandırılan iplik stabil bir şekilde RISC'yi oluşturmaktadır. Şekil 2.20'de gözlendiği gibi miRNA olarak adlandırılan diğer iplik atılır. Bireysel miRNA duplekslerinin 5' (5p) ve 3' (3p) dizilerinden türetilen olgun miRNA'ların oranları değişmektedir ve her iki zincir de bazı miRNA'lar için işlevseldir. Karışıklığı önlemek için, 5' (5p) ve 3' (3p) kollarından olgun miRNA'lara sırasıyla -5p ve -3p son ekleri eklenmektedir. RISC'nin oluşumu hem miRNA'ları hem de Ago proteinlerini stabilize etmektedir [81].



Şekil 2.20: Kanonik miRNA'nın Biyogenez Yolu. miRNA biyogenezi, birincil miRNA transkriptlerinin transkripsiyonu, Drosha tarafından nükleer işleme, XPO5 tarafından nükleositoloplazmik dışa aktarma, Dicer tarafından sitoplazmik işleme ve Ago proteinleri ile RISC oluşumu dahil olmak üzere birçok adım tarafından yönetilir [81].

Yukarıda açıklanan kanonik miRNA biyogenezinin aksine, miRNA'lar kanonik olmayan biyogenez olarak sınıflandırılan bir Drosha ve/veya Dicer'den bağımsız bir şekilde üretilmektedir. Bugüne kadar, kanonik olmayan çok sayıda miRNA biyogenez yolu aydınlatılmıştır. Buna Drosophila kısa RNA dupleksleri örnek olarak verilebilmektedir. Bunlar, pre-miRNA'ların yapısal özelliklerini taklit eden "mirtronlar" olarak adlandırılan kısa intronik saç tokalarından türetilmektedir. Mirtronlar daha sonra Drosha sürecini atlar ve exportin-5 ile birlikte kanonik miRNA yolu ile birleşmektedir. Bundan sonra, Dicer tarafından bölünürler ve kanonik yola benzer şekilde susturma komplekslerine dahil edilirler [82].

Araştırmacıların yapmış olduğu birkaç çalışma, Drosha/DGCR8'in pri-miRNA'ları pre-miRNA'lara nasıl işlediğine dair anlayışımızı geliştirmiştir. Şekil 2.21a'da görüldüğü gibi pri-miRNA'ların bir dizi özelliğinin verimli pre-miRNA işleme için önemli olduğunu göstermişlerdir. Bu özellikler arasında pri-miRNA saç tokasının tabanında bir UG motifi, apikal halkada bir UGU(GUG) motifi, aCNC motif (SRp20/SRSF3-bağlama motifi) Drosha işleme bölgesinin aşağısında 16-18 bp, uyumsuz bir GHG bazal gövde bölgesinde motif ve dar bir aralıkta tolere edilebilir pri miRNA gövde uzunlukları (35 +/- 1 baz çifti) yer almaktadır. Bu dizi özellikleri, pri-miRNA'lar ile bir Drosha ve iki DGCR8'den oluşan heterotrimerik Drosha/DGCR8 kompleksi arasındaki etkileşimin yapısal özelliklerini barındırmaktadır. Drosha bazal gövde ile etkileşime girerek, bir bazal UG motifini tanımaktadır ve bazal ssRNA dsRNA bağlantısından 11 ve 13 bp işleme bölgesini tanımlamaktadır. DGCR8, gövde ve apikal bölgelerle etkileşime girerek ve apikal bir UGU motifini tanımaktadır [81].



Şekil 2.21: miRNA homeostazının nicel özellikleri. (a) Pri-miRNA'ları tanımlayan dizi özellikleri. (b) Asimetrik iplik seçiminin moleküler prensipleri. (c) miRNA metabolizmasının dinamikleri ve geniş transkripsiyon sonrası düzenleme. (d) Süper enhancer ile miRNA ağının hiyerarşisi arasındaki ilişkiler [81].

miRNA iplik seçiminin asimetrisinin altında yatan mekanizmalar için model yakın zamanda revize edilmiştir (Şekil 2.21b). Araştırmacılar sistematik biyokimyasal çalışmalarıyla küçük RNA asimetrisinin doğrudan Ago proteinleri tarafından yönlendirildiğini göstermişlerdir. Ago2, 5'-üridin veya 5'-adenozin ve potansiyel kılavuz ipliklerin 5' nükleobazları ve 5'-fosfatları ile temas eden MID alanındaki iki algılayıcı bölge aracılığıyla paralel olarak, kararsız 5' uçları olan iplikleri seçmektedir. Bu nedenle miRNA asimetrisinde, 5' uç nükleotid kimliğini ve termodinamik stabiliteyi yansıtarak üst üste binmiş durum söz konusu olmaktadır [81].

Fosforilasyon dahil olmak üzere biyogenez faktörlerinin bir dizi protein modifikasyonunun miRNA homeostazını modüle ettiği bildirilmektedir. miRNA modülatörlerinin yakın zamanda yapılan bir CRISPR/Cas9 tabanlı taraması, Ago2'nin CSNK1A1 tarafından fosforile edildiğini ve ANKRD52-PPP6C fosfataz kompleksi tarafından defosforile edildiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, Ago2'nin fosforilasyonu, miRNA'nın varlığında eşlik eden bir azalma olmaksızın hedef mRNA bağlanmasını ve hedef baskılamayı inhibe etmektedir (Şekil 2.21c). Ago2 fosforilasyonunun, hedef baskılamının geç aşamalarında meydana geldiği görülmektedir. Bu fosforilasyon döngüsü, RISC'yi, hedef mRNA'dan diğerine yönlendirmek için önemli olabilmektedir, böylece yüzlerce hedef mRNA'nın baskılama etkinliğini kontrol etmektedir. Ek olarak, birden fazla rapor, Lin28 dahil olmak üzere çeşitli RBP'lerin aracılık ettiği miRNA işleminin geniş transkripsiyonel mekanizmalarını tanımlamıştır (Şekil 2.21c) [81].

Epigenetik düzenleme, miRNA ifadesini modüle eden DNA metilasyonu ve kromatin/histon modifikasyonlarını içermektedir. miRNA'lar çeşitli epigenetik düzenleyicileri düzenlemektedir. Araştırmacılar literatür taramasına göre, 23 kanser türünde yaklaşık 120 miRNA'nın epigenetik olarak modüle edildiğini ve insan miRNA genlerinin metilasyon sıklığının, protein kodlayan genlerinkinden çok daha fazla olduğunu ileri sürmüştür. Bu görüşle tutarlı olarak, miRNA genlerinin, metilasyona duyarlı CpG adaları ve kanserle ilişkili genomik bölgeler ile sıklıkla örtüştüğünü bulmuşlardır. Pri-miRNA'ların CpG adalarına yakınlığı, intragenik miRNA'lardan ziyade intergenik miRNA'lara yöneliktir. CpG adalarının veya kalıntılarının metilasyonu, konakçı gen promotörünün, intronik miRNA promotörünün, CpG adaları ile örtüşen veya proksimal miRNA gen promotörünün aktivitelerini azaltmaktadır. Bunun sonucunda da farklı miRNA ifadeleri görülebilmektedir. Ek olarak, histon modifikasyonları miRNA ifadesini ya aktive etmektedir ya da baskılamaktadır. Araştırmacıların, meme kanseri hücrelerini kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada, histon deasetilaz inhibitörlerinin miRNA ifadesinde hızlı ve yaygın değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Bu hızlı yanıt, epigenetik düzenlemenin, bir pri-miRNA işleme mekanizmasının varlığı ile tutarlı olarak, ortak transkripsiyonel ve/veya transkripsiyon sonrası pri-miRNA işlenmesini etkilediğini göstermektedir [81].

MiRNA'lar çeşitli gelişimsel süreçlerin önemli düzenleyicileridir. miRNA biyogenezinin düzensizliği ve gen susturma, tüm hematolojik malignite spektrumu ile ilişkilendirilmektedir. miR-155'in aşırı ifadesi; ALL, KLL, kutanöz T hücreli lenfoma (KTHL) ve diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) ve ayrıca diğer hematolojik malignitelerde bildirilmiştir. Fulci ve arkd. sağlıklı donörlere kıyasla KLL hastalarından alınan CD19+ B hücrelerinde miR-150'nin önemli ölçüde up regüle edildiğini göstermiştir. Hücresel süreçlerin uygun şekilde düzenlenmesini sürdürmek için miRNA'lara ihtiyaç duyulduğundan, deregülasyonları hematolojik malignite gelişimine, ilerlemesine ve metastaza yol açmaktadır. Hematolojik malignitelerde anormal miRNA ifadesi, miRNA genomik lokuslarındaki genomik varyasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Örneğin, miR-15/miR-16 kümesinin genomik lokusu B-KLL'de yüksek frekansta delesyona uğramıştır. Azalan miR-146a ifadesi, AML'de 5q kromozomunun delesyonunun bir sonucu olarak da bastırılmaktadır [82].

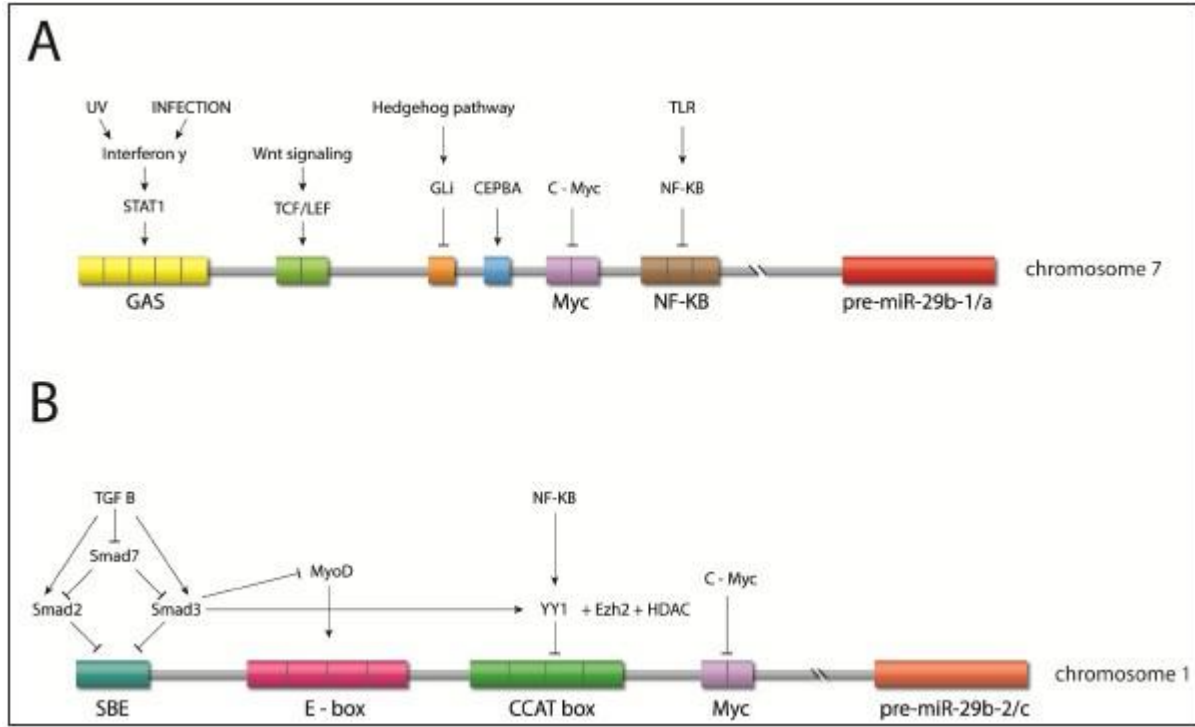
Teorik olarak miRNA'ların işlevi, diziye özgü bir hedef genin bastırılmasına aracılık etmektir. Bu nedenle, belirli bir miRNA'nın kanserdeki rolü (onkojenik veya tümör baskılayıcı), sözde inhibisyon hedeflerine bağlı olmaktadır. Onkogenleri baskılayan miRNA'lar, tümör baskılayıcı miRNA'lar olarak düşünülürken, tümör baskılayıcıları hedefleyenler potansiyel olarak onkojenik miRNA'lardır (oncomir) [83].

2.8.3.1. Miyeloid Malignitede miR-29 Ailesi

İnsan miR-29 ailesi 3 üyeden oluşmaktadır. Bunlar; miR-29a, miR-29b ve miR-29c'dir. miR-29'ların yapısı, işlevi ve düzenlenmesi insan, fare ve sıçanda yüksek derecede homologtur. MiR-29a ilk olarak HeLa hücrelerinde Lagos-Quintana tarafından tespit edilmiştir, ardından miR-29b ve miR-29c bulunmuştur. miR-29 ailesinin öncüleri, miR-29a/b-1 kümesi ve miR-29b-2/c kümesi olmak üzere 2 bi-sistronik kümede kopyalanmaktadır. miR-29a/b-1 kümesi kromozom 7'de (7q32), miR-29b-2/c kümesi kromozom 1'de (1q32) bulunmaktadır [84]. miR-29b-1 ve miR-29b-2'nin olgun dizileri özdeştir, miR-29a ve miR-29c ise miR-29b'den farklıdır ve sadece tek bir nükleotitteki farklılık ile birbirinden ayırt edilmektedir. MikroRNA ailesinin her bir üyesi, aynı "çekirdek alanı" ile karakterize edilmektedir ve bu nedenle mikroRNA ailesi üyeleri, mRNA hedeflemelerinde örtüşmektedir. Benzer dizilere rağmen, miR-29 ailesi üyeleri farklı hücre altı oluşumuna sahiptir. miR-29a esas olarak sitoplazmik olduğundan, miR-29b çekirdekte daha fazla bulunmaktadır. Polisistronik birincil transkript miR 29a/miR-29b-1'i içermektedir ve olgun miR-29a ve miR-29b'nin hücre altı lokalizasyonu, 3' uç dizileri nedeniyle farklıdır.

Olgun miR-29b'deki AGUGUU'nun terminal 3' ucu, bir transkripsiyon veya splicing düzenleyicisi olarak hareket edebileceği çekirdeğe aktarılmasından sorumludur.

MiR-29 ailesinin düzenlenmesinin iki yolu vardır. Ya promotör bölgesindeki transkripsiyon faktörleriyle düzenlenmektedir (Şekil 2.22), ya da; transkripsiyon sonrası düzenleme gerçekleşmektedir. miR-29a/b-1 ve miR-29b-2/c kümelerinin promotör düzenlemesi arasındaki farklar, dokular arasında miR-29a, miR-29b ve miR-29c ifadesinin tutarsız oranından kaynaklanabilmektedir.



Şekil 2.22: Kromozom 1 ve 7 üzerindeki transkripsiyon faktörleri ile miR-29 kümelerinin düzenlenmesi. Panel A – Kromozom 7 üzerinde pre-miR-29b-1/a kümesinin düzenlenmesi Gli, C Myc ve NF- κ B transkripsiyon faktörleri için negatif düzenleme gösterilmiştir. STAT1, TCF/LEF ve CEPBA için pozitif düzenleme (oklar) gösterildi. Panel B – Kromozom 1 üzerinde pre-miR-29b-2/c kümesinin düzenlenmesi. TGF β 'den Smad2/3, YY1 ve C-Myc'e kadar negatif düzenleme gösterilmiştir. Pozitif düzenlemeye MyoD aracılık etti [85].

Transkripsiyon faktörü Myc için bağlanma bölgeleri, her iki miR-29 kümesinin promotör bölgesinde tanımlanmaktadır. Myc, birçok insan malignitesinde patolojik olarak aktive olan onkogenik bir transkripsiyon faktörüdür. Myc tüm miR-29 ailesi üyelerinin ifadesini negatif olarak düzenlemektedir. miR-29b-1/a promotör bölgesi, kanonik bir E-box Myc bağlanma bölgesi içermektedir ve c-Myc azaltılmış promotör aktivitesinin zorunlu ifadesini %50 oranında azaltmaktadır. Araştırmacılar, miR-29 ifadesinin c-Myc tarafından bastırıldığını verilerle doğrulamıştır. Ayrıca miR-29b-1/a promotörünün, Hedgehog sinyal yolu ile düzenlenebilen Gli bağlanma bölgesi içerdiğini göstermişlerdir. CCAAT/Arttırıcı Bağlanma Proteini A (CEBPA)'yı bağlanma bölgesi miR-29b-1/a promotöründe tanımlamışlardır. miR-29b-1/a promotör bölgesi ayrıca osteoblast farklılaşması için gerekli olan T-hücre faktörü/lenfoid güçlendirici faktör (TCF/LEF) için iki bağlanma bölgesi içermektedir. MiR-29a ifadesi, kanonik Wnt sinyali ile indüklenmektedir. Bu etkiye, proksimal promotör içindeki iki TCF/LEF bağlanma bölgesi aracılık etmektedir. Bu da osteoblast farklılaşması için gereklidir [85].

Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmaların sonucu, miR-29 aile üyelerinin ifadesinin hematolojik malignitelerde geniş ölçüde deregüle edildiğini ve bunun yeniden yapılandırılmasının kanser hücrelerinin fenotipini etkilediğini göstermektedir. Önemli olarak, miR-29'ların anti-tümör aktivitesi, genellikle, içsel epi-miRNA aktiviteleri tarafından indüklenen kanser hücresi epigenomundaki değişikliklere dayanmaktadır. Bu tür hastalıklarda miR-29 ifade düzeylerine ilişkin sonuçlar oldukça tartışmalıdır, bu farklılık çalışmalar için kullanılan farklı platformlara ve analiz edilen farklı AML alt tiplerine bağlı olmaktadır. Literatürde sürekli olarak farklı biyolojik fonksiyonlarla birlikte miR-29 ailesi üyelerinin farklı ifade düzeyleri ortaya çıkmaktadır [84].



3. MATERYAL ve METOD

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Ekipmanları

- Real-Time PCR Cihazı (Applied Biosystems, ABI 7500, Singapur)
- Santrifüj (Nüve, NF-800, Türkiye)
- Santrifüj (Nüve, NF-400, Türkiye)
- Santrifüj (Nüve, NF-048, Türkiye)
- Mikrosantrifüj (Nüve EN-500, Türkiye)
- Mikrosantrifüj Tüpü (Axygen, MCT-150-A, ABD)
- Vorteks (VELP, Scientifica, İtalya)
- Nanodrop (Thermo Scientific, ND 2000, ABD)
- Derin Dondurucu (Arçelik, 2031D, Türkiye)
- Buzdolabı (Arçelik, 8188 NF, Türkiye)
- Etüv (Nüve, FN 500, Türkiye)
- Otoklav (Nüve StreamArt, OT 40 L, Türkiye)
- Mikropipet (100-1000 µl), (Star Labs, S7110-1000, Almanya)
- Mikropipet (20-200 µl), (Eppendorf Research, 3123000055, Güney Amerika)
- Mikropipet (10-100 µl), (Ahn, GL838601, Almanya)
- Mikropipet (0,5-10 µl), (Ahn, GB831568, Almanya)
- Mikropipet (0,2-2 µl), (Thermo Electron Corporation, V89173, ABD)
- Mikropipet (2-20 µl), (Thermo Electron Corporation, V57018, ABD)

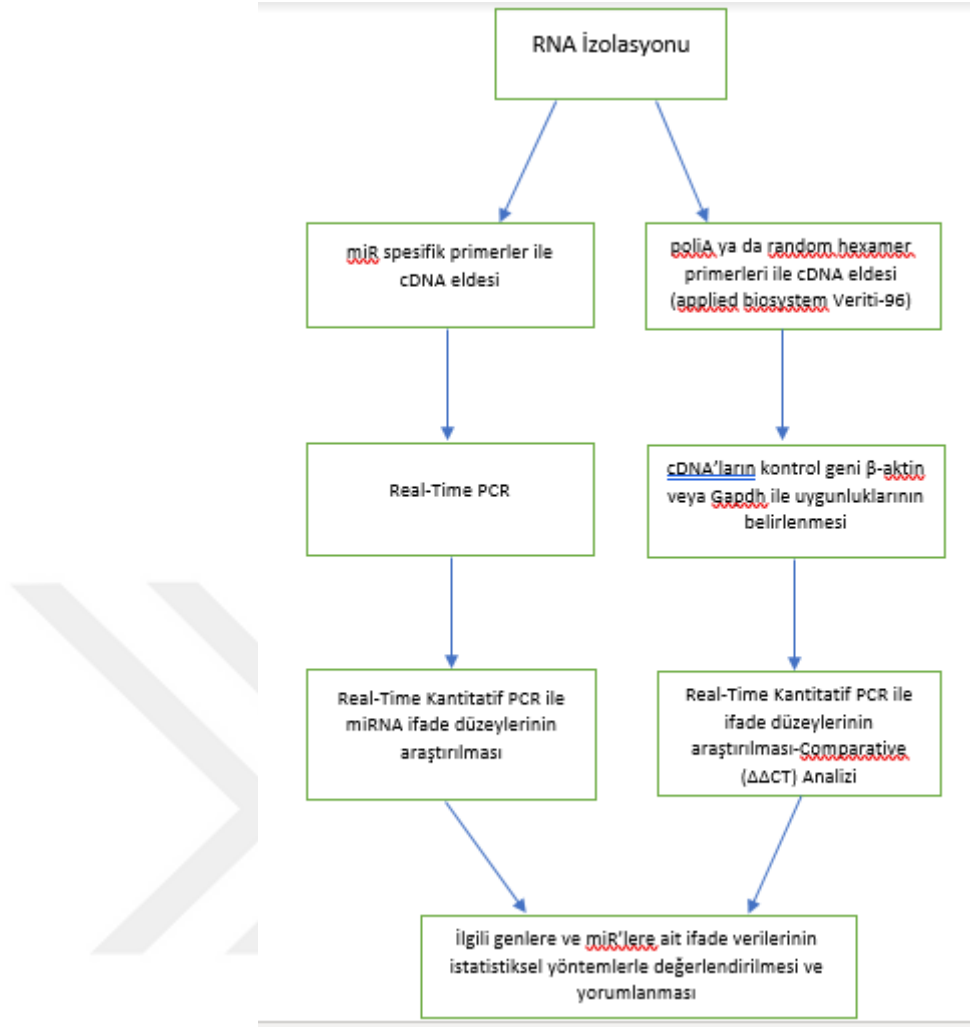
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- TRIzol™ Reagent (15596026, Invitrogen, ABD)
- Kloroform:İzoamilalkol(24:1) (Sigma-Aldrich, C0549-1PT, Almanya)
- İzopropanol (Sigma, I9516, Kanada)
- Etanol (Merck Millipore Corporation, 1009712500, Almanya)
- Distile su (Polifarma, PS-808034, Türkiye)
- dNTP(10µm) (Invitrogen, AM8200, ABD)
- RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µL) (Thermo Scientific, EP0441, ABD)
- 5 x RT Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT) (Thermo, EP0441, ABD)
- Ribolock RNase Inhibitor (40 U/ µl) (EO0382, Thermo Scientific, ABD)

- Oligo(dT) (MWG-Biotech AG, 18, Almanya)
- Master mix (Applied Biosystems, 4305719, ABD)
- Pipet ucu 10 µl'lik (Axygen, T-300, ABD)
- Pipet ucu 200 µl'lik (Axygen, T-200-Y, ABD)
- Pipet ucu 1000 µl'lik (Axygen, T-1000-B, ABD)
- Real Time PCR Plate (Applied Biosystems, 4306737, ABD)
- Real Time PCR Plate Kaplama Filmi (Applied Biosystems, 4311971, ABD)
- Real Time PCR Plate Tutucu (Applied Biosystems, ABD)
- Primer ve Problar

3.3. Kontrol ve Hasta Grubunun Seçimi

Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenen 'Miyeloid Malignitelerde, *TET2* ve *DNMT3A* Genleri ile hsa-miR-29 İfade Düzeylerinin Araştırılması' adlı tez çalışmamız, Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 19.02.2020 tarihli ve 2020/116 sayılı kurul kararıyla uygun bulunmuştur. Çalışmamıza, Temmuz 2015 ve Mart 2018 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Bölümü Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran toplam 102 gönüllü hastaya ait, rutin amaçlı alınmış koleksiyon kemik iliği örnekleri dahil edilmiştir. 13 örnekten oluşan kontrol grubumuz ise; herhangi bir hematolojik malignite tanısı almayan hastaların kardiyovasküler cerrahi sırasında sternumlarının kesilmesiyle operasyon alanına sızan ve herhangi bir tanısız ya da tedavi değeri olmayan, cerrah tarafından aspire edilerek atılan kemik iliği örneğinden oluşmaktadır. Bu çalışmada kullanılan kemik iliği örnekleri arşiv materyali olup BAP tarafından desteklenmektedir. Hasta grubunu ve kontrol grubunu oluşturan bireylere araştırmayı kabul ettiklerine dair bilgilendirilmiş onam formu imzalatılmıştır. Çalışmamız, Şekil 3.1'deki iş akış şemasında gösterilen temel basamaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: İş akış şeması.

3.4. Kemik iliğinden RNA İzolasyonu

Dondurucuda -80 °C'de saklanan kemik iliği örnekleri alındı ve çözülmesi için beklendi. Ardından geleneksel guanidyum- isotiyosiyonat / fenol- kloroform izolasyon yöntemi kullanılarak kemik iliği örneklerinden manuel RNA izolasyonu yapıldı.

- Kemik iliği örneklerinden 300 µl alınarak 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi.
- Üzerine 500 µl ribozol (trizol) eklenip vorteksenerek 15 dk buz içinde inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası örneklerin üzerine +4 °C 'de muhafaza edilen 200 µl kloroform: izoamilalkol (24:1) eklendi ve vortekslendi.
- Mikrosantrifüj tüpleri +4 °C'de 14.000 RPM'de 10dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası örnekler, üstte açık sıvı fazda RNA, ortada beyaz bulutsu fazda DNA ve altta kırmızı fenol fazda protein olmak üzere üç ayrı faza ayrıldı.

- RNA'nın bulunduğu üstteki faz pipet yardımıyla alınarak etiketli tüplere transfer edildi.
- Üzerine 500 µl izopropanol eklendi ve RNA'nın çökmesi için oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- Tüpler +4 °C'de 10 dk 14.000 RPM'de santrifüj edildi.
- Supernatant, pelletin alt-üst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
- Pellet üzerine 1ml hacimde %80'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA'nın yıkanması sağlandı. Ardından örnekler 24 saat -20 °C'de bekletildi.
- Tüpler -20 °C'den çıkartılıp +4 °C'de 10 dk 14.000 RPM'de santrifüj edildi.
- Supernatant atıldı ve etanolün kalmamasına dikkat edilerek kuruma için 15 dk inkübe edildi.
- RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl aprotjen distile su ilave edildi.
- Düşük devirde 10 sn vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra tüpler -20 °C'de saklandı.
- Tüm RNA örneklerinin spektrofotometrik ölçümleri yapıldı.
- Tüm RNA örnekleri ölçüm sonrası 40 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde steril aprotjen su ile seyreltildi.
- cDNA sentezi ve Real-Time PCR işlemleri öncesinde her bir reaksiyonda eşit miktarda RNA kullanıldı.

3.5. cDNA Sentezi

3.5.1. DNMT3A ve TET2 Geni cDNA Sentezi

cDNA sentezi için kullanılacak olan kimyasallar ve RNA örnekleri -20 °C'den çıkarıldı ve çözüldü. Kimyasallar kısa süreli santrifüj edildi. Ardından Tablo 3.1'deki bileşenler kullanılarak cDNA reaksiyon karışımı toplam hacmi (41,7x120) 5004 µl olacak şekilde hazırlandı. Real-Time PCR Plate kuyucuğunun her birine tabloda bir tüp için verilen miktarda reaksiyon karışımı koyuldu ve üzerlerine 5 µl RNA örneği eklendi.

Tablo 3.1: cDNA sentezinde kullanılan bileşenler.

Sarf Malzeme	1 Kuyucuk İçin Miktar	Örnek Sayısı	Kullanılan Malzeme	Toplam
dH ₂ O	24µl	115		2760µl
dNTP (10µm)	4µl	115		460µl
Reverse Transcriptase (RT) (20 U/ µm)	0,2µl	115		23µl
5 x Buffer	8µl	115		920µl
RNase Inhibitor (40 U/ µm)	0,5µl	115		57,5µl
Poly T	5µl	115		575µl
Toplam Hacim	41,7	115		4795,5µl

Çalışmada referans olarak kullanılmak üzere '0' örneği hazırlandı ve tüm kontrol örneklerinden (13) 10'ar µl RNA (toplamda 130 µl) alınarak eppendorf tüpüne aktarıldı. Mikropipet yardımıyla pipetaj yapılarak homejenizasyon sağlandı. Bu karışımdan 13 kuyucuğa 5'er µl eklendi ve üzerine 1 kuyucuk için belirtilen miktar ilave edildi. Bu işlem için 41,7x 13 =542,1 µl hacimde ayrı olarak hazırlanmış cDNA karışımı kullanılmıştır.

Real-Time PCR Plate'i 2000 RPM'de kısa süre santrifüj edildi. Hemen ardından Real-Time PCR cihazına yerleştirildi. Uygun PCR reaksiyon koşullarında cDNA elde edildi. PCR reaksiyon koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Real-Time PCR reaksiyonu çalışma koşulları.

	Sıcaklık	Süre
Aktivasyon	16 °C	30 dk
Reverse-Transkriptaz	42 °C	30 dk
Enzim Aktivasyonu	85 °C	8 dk
Bekleme	4 °C	2 dk

3.5.2. miR-29 cDNA Sentezi

Hasta ve kontrol gruplarından manuel yöntemle elde ettiğimiz RNA örneklerinden cDNA sentezinde her bir örnekten 2 µg/µl olacak şekilde RNA kalıp, Reverse Tanskriptaz ve ölçüm yapılacak miRNA' nın primerleri kullanılarak 5 µl' lik reaksiyon karışımı oluşturuldu. Reaksiyon karışımları ve koşulları aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.3' deki miktarlar baz alınarak 2000 µl' lik reaksiyon tüpünde 1. Karışım (reaksiyon karışımı) hazırlandı ve 10 dk -20°C'de bekletildi. Tablo 3.4'teki gibi, Reaksiyon karışımı, RNA kalıp, dH₂O miktarlara göre total hacim 15 µl olacak şekilde her bir hasta ve kontrol için 500 µl'lik reaksiyon tüplerine konuldu ve 5 dk kadar 90°C'de etüvde bekletildi. 2000 µl'lik reaksiyon tüpünde hazırlanan karışım, içerisinde, su ve kalıp RNA bulunan tüplere eşit miktarda (5 µl) dağıtıldı ve her bir reaksiyon tüpünde son hacim 15 µl oldu. cDNA reaksiyon tüpleri, 37°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk olacak şekilde thermal cyler cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örnekler, Real-time PCR uygulamasına kadar -20°C'de bekletildi.

Tablo 3.3: miR-29 cDNA Reaksiyonu İçin Kullanılan Karışımlar 1.

	Her bir hasta ve kontrol için eklenecek miktar
dNTP 10mM	1,5 µl
5XBuffer (Tampon)	3 µl
RNaz inhibitör 40 U/µl	0,1 µl
RT primer	0,2 µl
Revers Transkriptaz 20 U/ µl	0,25 µl
TOPLAM	5 µl

Tablo 3.4: miR-29 cDNA Reaksiyonu İçin Kullanılan Karışımlar 2.

	Her bir hasta ve kontrol için eklenecek miktar
Reaksiyon karışımı	5 µl
RNA kalıp	2 µg/µl
dH ₂ O	10 µl - Kalıp RNA miktarı
TOPLAM	15 µl

3.6. Real-Time Kantitatif PCR ile Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Miyeloid malignitesi olan hastaların ve kontrol grubu hastaların kemik iliği örnekleri kullanılarak elde edilen RNA'larla cDNA'lar oluşturuldu. Bu cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak floresan hibridizasyon probu aracılığıyla kantitatif Real-Time PCR ile ekspresyon analizi yapıldı.

Bu tez çalışmasında araştırılan *DNMT3A*, *TET2* genleri ve miR-29a, miR-29b ve miR-29c miRNA ekspresyon değişimleri belirlendi ve *DNMT3A* ve *TET2* için *ACTB* geni referans olarak kullanılmıştır. miR-29a-3p, miR-29b-3p ve miR-29c-3p için ise miR-26b referans olarak kullanılmıştır. İlgili genlerin ve miR'lerin ekspresyonları *ACTB* ve miR-26b oranına göre katlı değişim (fold-change) olarak hesaplandı. Ekspresyon düzeyinin kantitasyonu $\Delta\Delta C_t$ yöntemi ile yapılmıştır.

Çalışılacak olan genlerin Taqman problemlerinin 5' ucu ışığa yapışabilen FAM ile, 3' ucu bu ışığı soğurabilen BHQ ile işaretlenmiştir. *ACTB* geninin 5' ucu ışığa yapışabilen VIC ile, 3' ucu bu ışığı soğurabilen TAMRA boyası ile işaretlenmiştir. Prob, hedef molekül üzerinde F ve R primerlerin ortasına bağlanmaktadır. Primerler uzayıp probun bağlanma noktasına geldiği zaman DNA polimeraz enziminin 5'→3' nükleaz aktivitesi nedeniyle prob 5' ucundan degrade olmaktadır. Böylece 5' kısmında bulunan FAM ve VIC'in ışığa yapması sağlanır. Bu ışık miktarı Real-Time PCR cihazı tarafından saptanmakta ve analiz edilmektedir.

Her bir miRNA için kullanılan primer ve florojenik ZNA™ problemler (Metabion International AG) Primer ekspres 3.0 programı (Applied Biosystems) kullanılarak dizayn edilmiştir. Kullanılan problemlerin 5' ucu ışığa yapışabilen FAM ile, 3' ucu bu ışığı soğurabilen BHQ ile işaretlenmiştir. Primer içindeki sitozinler yerine C-5 propinildeoksiribo sitozin (pdc) kullanılarak Tm değerleri artırılmıştır. Ayrıca problemler sentezlenirken kullanılan sıkıştırılmış nükleik asitler (zip nucleic acids- ZNA) ile de Tm değeri artışı yoluyla hedefe bağlanma özgünlüğü artırılmıştır.

Genler ve miRNA'lar için dizayn edilen primer ve prob dizileri Tablo 3.5 ve Tablo 3.6'da listelenmiştir.

Tablo 3.5: *DNMT3A*, *TET2* ve *ACTB* genlerinin primer ve prob dizileri.

Gen Adı ve ID	Primer/Prob Türü	Primer/Prob Dizisi
<i>DNMT3A</i> ID: 1788	F Primer	5'-GCCGCTGAGCTCGTTTG-3'
	R Primer	5'-GTAGATGGCTTTGCGGTACATG-3'
	Prob	5'-FAM-GCGTTCCACCAGGCCACGTACA- BHQ-1-3'
<i>TET2</i> ID: 54790	F Primer	5'-GAGCCCACTTACCTGCGTTTC-3'
	R Primer	5'-CGAGTGAAGGCATATGGAGATG-3'
	Prob	5'-FAM- CTCTTGCCGAAAGGACCATGTCCGT-BHQ- 1-3'
<i>ACTB</i> ID: 60	F Primer	5'-AAACTGGAACGGTGAAGGTG-3'
	R Primer	5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-3'
	Prob	5'-VIC-TCCCCCAAAGTTCACAATGT-TAMRA-3'

Tablo 3.6: miR-29 ve mirR-26 primer ve prob dizileri.

miRNA Adı ve ID	Primer/Prob Türü	Primer/Prob Dizisi
hsa-miR-29a-3p ID: 407021	F Primer	5'-GCCGCTAGCACCATCTGAAAT-3'
	R Primer	5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGCATACGACTAACCG- 3'
	Prob	5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)TAACCG-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-29b-3p ID: 407024	F Primer	5'-GCCGCTAGCACCATTGAAATC-3'
	R Primer	5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGCATACGACAACACT- 3'
	Prob	5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)AACACT-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-29c-3p ID: 407026	F Primer	5'-GCCGCTAGCACCATTGAAAT-3'
	R Primer	5'- GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGCATACGACTAACCG- 3'
	Prob	5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)TAACCG-ZNA4-BHQ-1-3'
hsa-miR-26b ID: 407017	F Primer	5'-GCCGCTTCAAGTAATTCAGG-3'
	R Primer	5'-GTCGTATGCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGCATACGACACCTAT-3'
	Prob	5'-FAM-TG(pdC)ATA(pdC)GA(pdC)A(pdC)CTATCC-ZNA4-BHQ-1-3'

Real-Time PCR analizinde kullanılacak primer-prob konsantrasyonları ve termal döngü parametreleri önceden optimize edilmiştir. Real-Time PCR cihazı ile analiz aşamasında uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

- Alınan primer ve problemler kataloglarında belirtilen şekilde saf su ile sulandırıldı, ardından en düşük hızda vorteksenerek çözünme ve homojenizasyon sağlandı.
- cDNA örnekleri ve Real-Time PCR için gerekli olan Master mix -20°C'den çıkarılıp çözündürüldü.
- Her bir gen için bir adet uygun hacimli ependorf tüpünün (1,5 mL) üzeri isimlendirildi.
- Real-Time PCR çalışması için gerekli olan reaksiyon bileşimi hazırlandı.

- Reaksiyon bileşimi tüpte oluşturulduktan sonra hafifçe pipetaj yapılarak homojen hale getirildi.
- Plate tasarımına göre çalışılacak tüpten 20 µl alınarak her bir plate kuyucuğuna eklendi.
- Kuyucuklar içinde bulunan bileşiminin üzerine 5 µl cDNA eklendi.
- Plate'nin üzeri film ile kapatıldı.
- Plate 2000 RPM'de 2 dk santrifüj edildi.
- Plate Real-Time PCR cihazının içine yerleştirildi ve analiz başlatıldı.
- Analiz programı, 'Ön Bekletme Aşaması' 50°C'de 2 dk. 'Bekletme Aşaması' 95°C'de 10 dk, 'Döngü Aşaması' (50 döngü) 95°C'de 15 saniye; 60°C'de 1.30 dk olacak şekilde ayarlandı.

Tablo 3.7: Real-Time PCR için gerekli bileşenler.

Solüsyon	Miktar
cDNA kalıp	5 µl
2 x TaqMan Universal PCR master mix	12,5 µl
Primer F	400 nM
Primer R	400 nM
TaqMan®Prob	400 nM
Primer F (miR)	900 nM
Primer R (miR)	900 nM
TaqMan®Prob (miR)	200 nM

3.7. Gen İfade Analizi

Bu çalışmada *DNMT3A*, *TET2* ve *miR29* ailesinin ifade seviyelerindeki değişimin incelenmesi için gen ifade analiz yöntemlerinden biri olan Livak K.J tarafından tanımlanan $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplama metodu kullanılmıştır. Bu metod hedef gen ile kontrol genin ifadelerinin karşılaştırılmasına dayanır. Real-Time PCR cihazından elde edilen Ct değeri üzerinden hesaplama yapılmaktadır.

3.8. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmaya ait verilerin istatistiksel analizi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı.

Hsa-miR-29 ailesinin (miR-29a, miR-29b ve miR-29c), *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin AML, KML, MDS, ET ve PV hastalarında ve kontrol grubunda ifade değişimleri Real-Time PCR yöntemi ile belirlendi. Ct değerleri üzerinden $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı. Elde edilen verilerin dağılımı Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Sayısal değişkenler normal varsayımının sağlanıp sağlanmadığına göre medyan [25P-75P] veya ortalama±standart sapma şeklinde, kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde cinsinden özetlenmiştir. İki denli fazla bağımsız grup karşılaştırması için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Anlamlılık tespit edilen değişkenler için post-hoc test olarak Dunn-Bonferroni testi kullanılmış olup, Box-Whisker grafiğı çizilmiştir. Yaş değerlerinin karşılaştırılması amacıyla ANOVA testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla ki-kare testinden yararlanılmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla ise Spearman korelasyon katsayısından yararlanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Miyeloid malignite tanısı almış bireylerin kemik iliği örneklerinden hsa-miR-29a, hsa-miR-29b ve hsa-miR-29c *TET2* ve *DNMT3A* ifade düzeylerini araştırmayı planladığımız bu tez çalışmasına 102 gönüllü hasta ve 13 gönüllü kontrol birey dahil edilmiştir. RNA izolasyonunu takiben nanodrop ile 260nm/280nm’de RNA saflık ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçların uygun aralıkta (1,6- 1,9) olduğunun belirlenmesinin ardından Real-Time PCR ile ifade düzeyleri araştırılmıştır. Hsa-miR-29a,b ve c, *TET2* ve *DNMT3A* genlerindeki ifade düzeyi değişimlerini belirlemek için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılmıştır.

4.1. Çalışma Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Tez çalışmamıza miyeloid malignite tanısı almış, 28 AML, 19 KML, 34 MDS, 11 PV ve 10 ET olmak üzere toplam 102 hasta örneği ve miyeloid malignite tanısı almamış 13 kontrol örneği dahil edilmiştir. Çalışma grubumuzda toplam 64 erkek birey ve 51 kadın birey bulunmaktadır. Cinsiyetlerin dağılımı bakımından gruplar arasında farklılık yoktur ($p=0,142$) (Tablo 4.1). Yaş değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,071$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.1: Hasta ve kontrol gruplarının cinsiyet dağılımı.

Cinsiyet		KONTROL	AML	KML	MDS	PV	ET	TOPLAM
Erkek	Sayı	8	15	14	18	7	2	64
	Yüzde	61,5%	53,6%	73,7%	52,9%	63,6%	20,0%	55,7%
Kadın	Sayı	5	13	5	16	4	8	51
	Yüzde	38,5%	46,4%	26,3%	47,1%	36,4%	80,0%	44,3%
Toplam	Sayı	13	28	19	34	11	10	115
	Yüzde	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tablo 4.2: Hasta ve kontrol gruplarının yaş dağılımı.

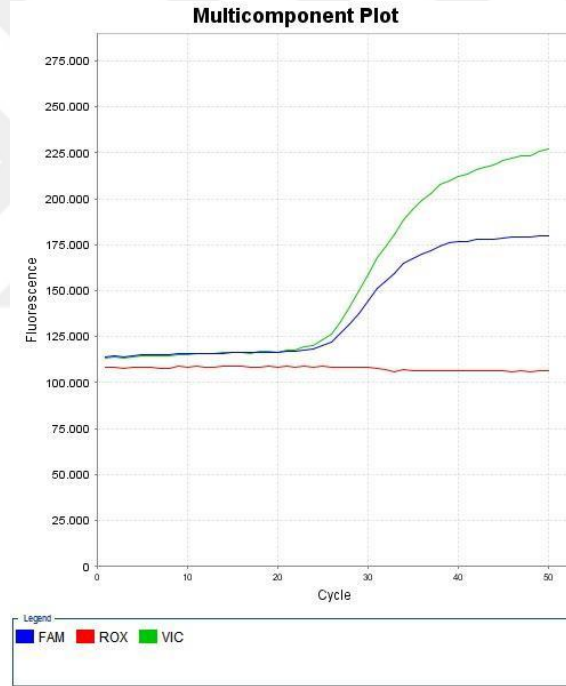
Grup	Kişi Sayısı	En Düşük Yaş	En Yüksek Yaş	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	13	22	80	62,00	14,600
AML	26	21	81	61,69	13,160
KML	19	35	87	58,79	15,810
MDS	34	50	88	69,26	9,385
PV	11	38	76	62,00	13,244
ET	10	34	85	59,50	17,501

4.2. Genlerin İfade Değişimlerinin Değerlendirilmesi

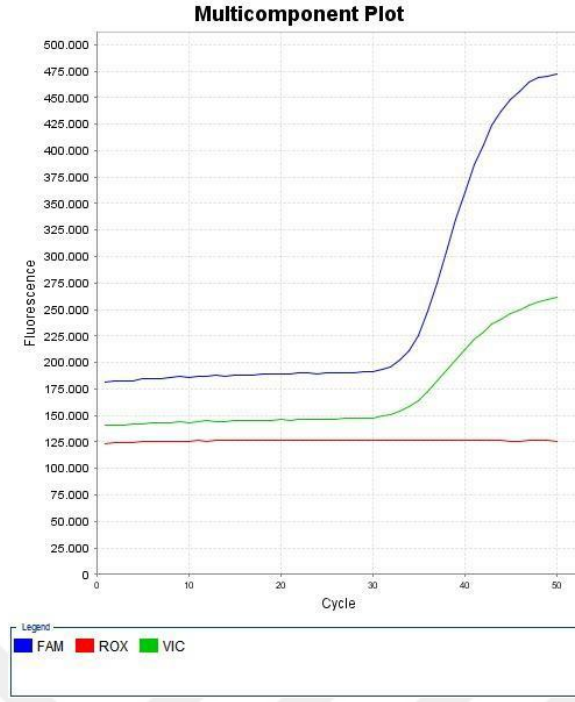
Genlerin ifade seviyeleri ve gruplar arasındaki ifade değerlerinin değişimleri RQ değerlerine göre tespit edilmiştir (Tablo 4.3). Tablonun ayrıntılarına alt başlıklarda değinilmiştir. Gruplar arasında tüm genler için ifade düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,001$). Bu değerler için farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Tüm genler gruplara ayırmaksızın birlikte değerlendirildiğinde, *DNMT3A* ile *miR-29a* arasında düşük, pozitif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,278$, $p=0,003$). *TET2* ile *miR-29a* arasında düşük, pozitif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,378$, $p<0,001$). *TET2* ile *miR-29b* arasında düşük, negatif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,276$, $p=0,003$). *TET2* ile *miR-29c* arasında düşük, pozitif yönde ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,307$, $p=0,001$).

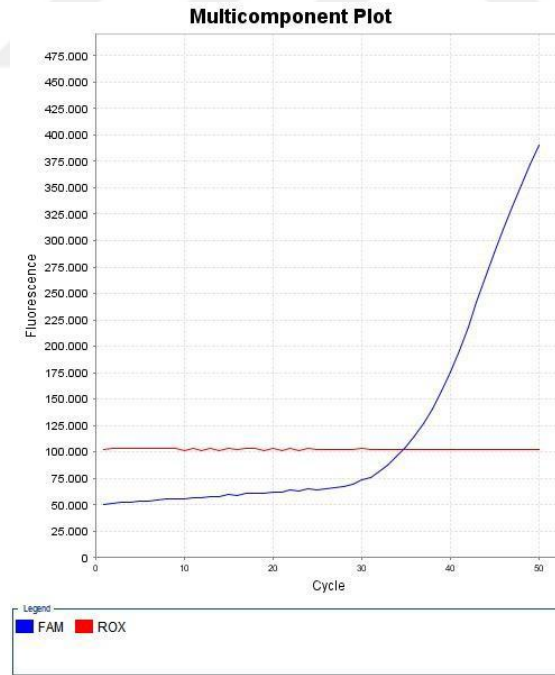
Real-Time PCR cihazında yapılan analizler sonucunda örnek grafikler Şekil 4. 1, Şekil 4. 2, Şekil 4. 3, Şekil 4. 4 Şekil 4. 5’de gösterilmiştir.



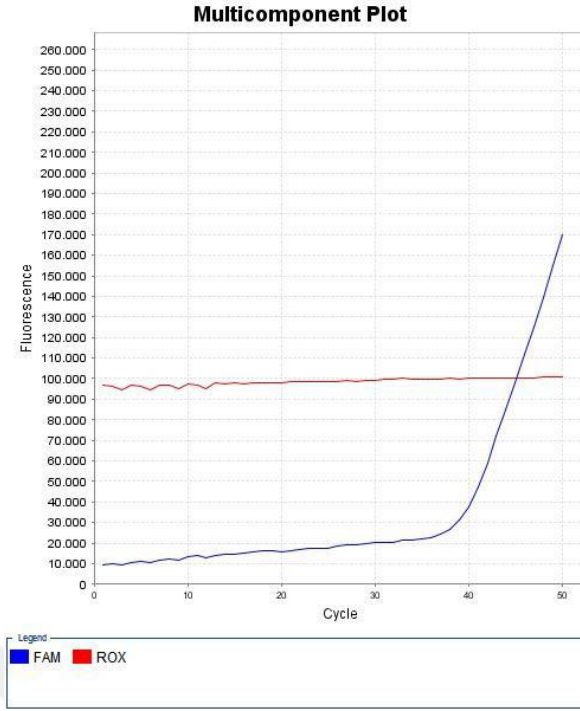
Şekil 4.1: KML örneğinde *DNMT3A* gen ifadesinin görüntüsü.



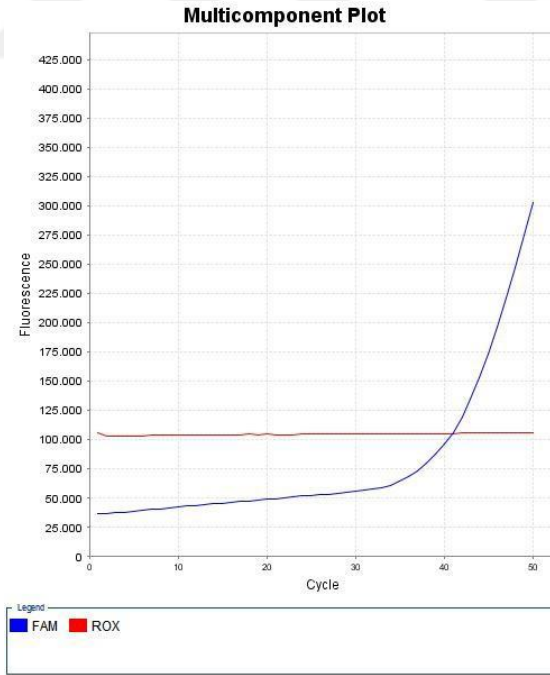
Şekil 4.2: MDS örneğinde *TET2* gen ifadesinin görüntüsü.



Şekil 4.3: ET örneğinde *miR-29a* ifadesinin görüntüsü.



Şekil 4.4: AML örneğinde *miR-29b* ifadesinin görüntüsü.



Şekil 4.5: PV örneğinde *miR-29c* ifadesinin görüntüsü.

4.2.1. DNMT3A İfade Seviyesindeki Değişimlerinin Değerlendirilmesi

DNMT3A geninin ifade seviyesi kontrol grubuna göre tüm hastalık grubunda azalmış olarak bulundu. Hastalıkların birbirine dönüşümü göz önüne alınarak hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla KML, MDS, ET ve PV gruplarında daha az *DNMT3A* ifadesi bulundu. *DNMT3A* ifadesi PV grubuna kıyasla daha fazla ET ifade seviyesi bulundu. Son olarak MDS grubuna kıyasla daha az KML, ET ve PV grubu bulundu. Bu bulguların istatistiksel anlamlılığı aşağıda verilmiştir.

Çalışmada çoklu gruplar bulunduğu için hastalık grupları ve kontrol grupları ikili olarak *Kruskal Wallis* testi kullanılarak kıyaslandı. Anlamlılık tespit edilen değişkenlerde kıyaslama *Dunn-Bonferroni* metodu kullanılarak düzenlendi ve sonuçlar *box and whisker* grafiği ile görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.1). *DNMT3A* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$). Bu farklılık ET ile AML ($p=0,042$), ET ile kontrol ($p=0,002$), PV ile kontrol ($p=0,004$), KML ile kontrol ($p=0,012$) ve MDS ile kontrol ($p=0,014$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Şekil 4.6).

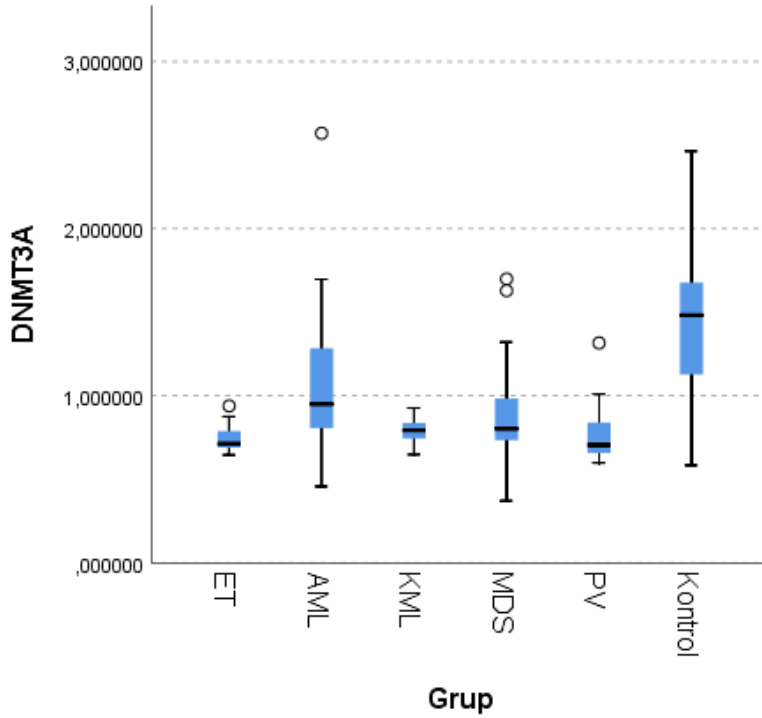


Tablo 4.3: *TET2* ve *DNMT3A*, genlerinin hasta ve kontrol gruplarındaki ifade değişimi.

	Kontrol (n=13)			AML (n=28)			KML (n=19)			MDS (n=34)			PV (n=11)			ET (n=10)			R
	Medyan	Yüzde		Medyan	Yüzde		Medyan	Yüzde		Medyan	Yüzde		Medyan	Yüzde		Medyan	Yüzde		
		25	75		25	75		25	75		25	75		25	75		25	75	
Gen- <i>DNMT3A</i>	1,4824	0,9756	1,6868	0,9503	0,7914	1,2859	0,7939	0,7269	0,8426	0,8027	0,7222	0,9940	0,7049	0,6326	0,9196	0,7128	0,6885	0,8106	<0,001
Gen- <i>TET2</i>	0,7742	0,5395	1,1537	1,0016	0,8409	1,1740	0,8821	0,7262	1,0017	0,8444	0,6675	0,9441	0,4996	0,2857	0,7287	0,9424	0,6915	1,0920	<0,001
Gen- <i>miR-29a</i>	1,7126	0,5752	8,5564	8,7966	1,3371	19,2786	0,9429	0,4700	2,2953	2,3251	0,2627	19,1242	0,0908	0,0325	0,3865	0,0755	0,0313	1,1352	<0,001
Gen- <i>miR-29b</i>	1,0306	0,3918	3,0178	0,0802	0,0250	0,1999	2,3166	1,0174	5,2508	0,1843	0,0875	0,8802	4,6905	2,7379	5,4857	2,8454	1,4757	7,2433	<0,001
Gen- <i>miR-29c</i>	1,1497	0,6449	4,3194	1,9073	0,1851	4,2764	0,3596	0,0810	0,6929	0,2392	0,0111	3,0232	0,0514	0,0349	0,0822	0,0472	0,0311	0,2719	<0,001

Tablo 4.4: *DNMT3A* gen ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
ET- Kontrol	-53,269	14,024	-3,798	0,001	,002
ET-PV	-3,136	14,568	-,215	,830	1,000
ET-KML	-12,974	13,026	-,996	,319	1,000
ET-MDS	-17,206	11,994	-1,435	,151	1,000
ET-AML	-36,750	12,283	-2,992	,003	,042
PV- Kontrol	-50,133	13,659	-3,670	0,001	,004
PV-KML	9,837	12,632	,779	,436	1,000
PV-MDS	14,070	11,565	1,217	,224	1,000
PV-AML	33,614	11,864	2,833	,005	,069
KML-Kontrol	-40,296	12,001	-3,358	,001	,012
KML-MDS	-4,232	9,550	-,443	,658	1,000
KML-AML	23,776	9,910	2,399	,016	,246
MDS-Kontrol	-36,063	10,872	-3,317	,001	,014
MDS-AML	19,544	8,509	2,297	,022	,324
AML- Kontrol	-16,519	11,190	-1,476	,140	1,000



Şekil 4. 6: Kontrol ve hasta gruplarında *DNMT3A* geni ifade değerleri. o uç değeri göstermektedir ve bu işaretleme sadece ortanca değerden olan uzaklığa göre çizilmiştir. Aynı zamanda parametrik olmayan yöntemler kullanılarak bu değerlere karşı istatistiksel açıdan önlem alınmıştır.

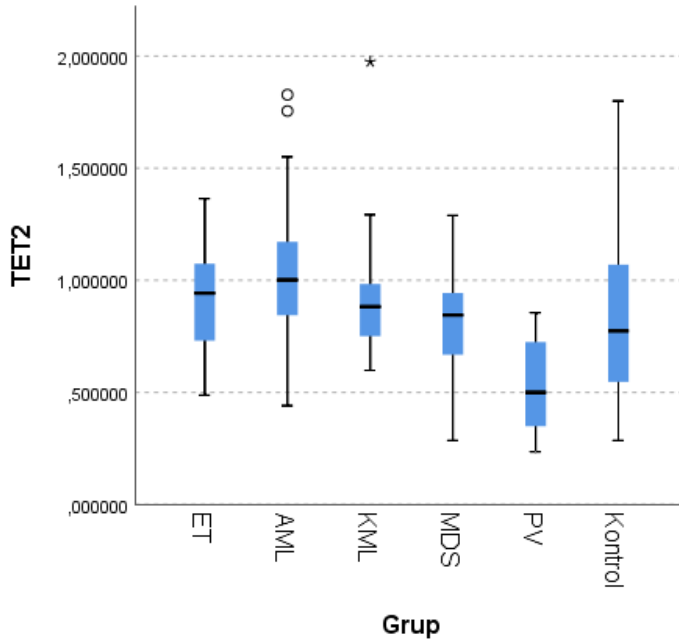
4.2.2. *TET2* İfade Seviyesindeki Değişimlerinin Değerlendirilmesi

TET2 geninin ifade seviyesi kontrol grubuna göre AML, KML, MDS ve ET gruplarında artmış olarak bulundu. Diğer yandan kontrol grubuna kıyasla PV grubunda azalmış olarak bulundu. Hastalıkların birbirine dönüşümü göz önüne alınarak hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubunda KML grubuna kıyasla daha fazla *TET2* ifadesi bulundu. AML grubuna kıyasla ise KML, MDS, ET ve PV gruplarında daha az *TET2* ifadesi bulundu. Son olarak ET grubunda PV grubuna kıyasla daha fazla *TET2* ifadesi bulundu (Tablo 4.5).

Çalışmada çoklu gruplar bulunduğu için hastalık grupları ve kontrol grupları ikili olarak *Kruskal Wallis* testi kullanılarak kıyaslandı. Anlamlılık tespit edilen değişkenlerde kıyaslama *Dunn-Bonferroni* metodu kullanılarak düzenlendi ve sonuçlar *box and whisker* grafiği ile görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.7). *TET2* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$). Bu farklılık, PV ile KML ($p=0,016$), ET ile PV ($p=0,030$), PV ile AML ($p=0,001$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Şekil 4.1).

Tablo 4.5: *TET2* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
PV- Kontrol	-34,965	13,659	-2,560	,010	,157
PV- MDS	31,008	11,565	2,681	,007	,110
PV-KML	41,273	12,632	3,267	,001	,016
PV-ET	44,973	14,568	3,087	,002	,030
PV-AML	55,130	11,864	4,647	0,001	0,001
MDS-Kontrol	-3,957	10,872	-,364	,716	1,000
MDS-KML	10,265	9,550	1,075	,282	1,000
MDS-ET	13,965	11,994	1,164	,244	1,000
MDS-AML	24,122	8,509	2,835	,005	,069
Kontrol-KML	6,308	12,001	,526	,599	1,000
Kontrol-ET	10,008	14,024	,714	,475	1,000
Kontrol-AML	20,165	11,190	1,802	,072	1,000
KML-ET	3,700	13,026	,284	,776	1,000
KML-AML	13,857	9,910	1,398	,162	1,000
ET-AML	-10,157	12,283	-,827	,408	1,000



Şekil 4. 7: Kontrol ve hasta gruplarında *TET2* gen ifadesinin değerleri. * aykırı bir değeri, o ise uç değeri göstermektedir ve bu işaretleme sadece ortanca değerden olan uzaklığa göre çizilmiştir. Aynı zamanda parametrik olmayan yöntemler kullanılarak bu değerlere karşı istatistiksel açıdan önlem alınmıştır.

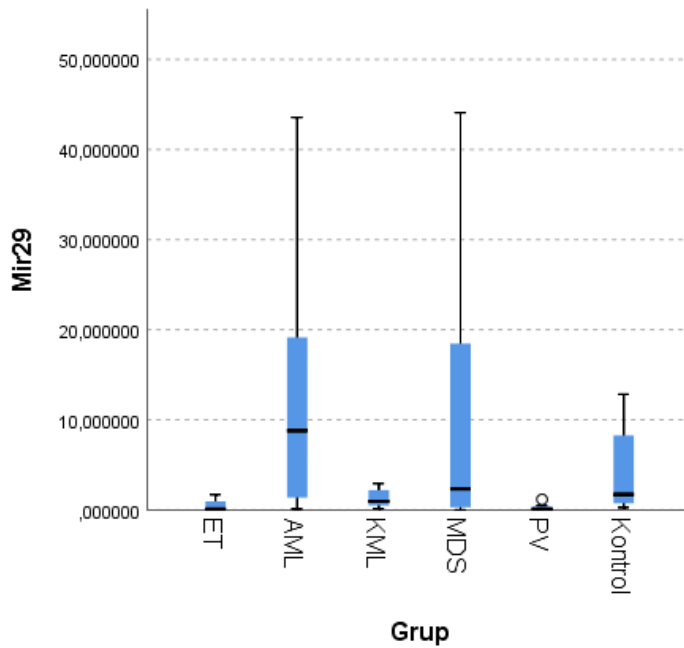
4.2.3. *miR-29a* İfade Seviyelerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

miR-29a ifade seviyesi kontrol grubuna göre KML, ET ve PV gruplarında azalmış olarak bulundu. Diğer yandan AML ve MDS gruplarında ise kontrol grubuna göre *miR-29a* ifadesi artmış olarak bulundu. Hastalıkların birbirine dönüşümü göz önüne alınarak hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla KML, MDS, ET ve PV gruplarında *miR-29a* ifadesi azalmış olarak bulundu. AML grubunda diğer hastalık gruplarına göre daha fazla *miR-29a* ifadesi bulundu. Son olarak ET ve PV gruplarındaki *miR-29a* ifadesi kontrol grubuna göre oldukça az bulundu (Tablo 4.6).

Çalışmada çoklu gruplar bulunduğu için hastalık grupları ve kontrol grupları ikili olarak *Kruskal Wallis* testi kullanılarak kıyaslandı. Anlamlılık tespit edilen değişkenlerde kıyaslama *Dunn-Bonferroni* metodu kullanılarak düzenlendi ve sonuçlar *box and whisker* grafiği ile görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.8). *miR-29a* ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$). Bu farklılık, PV ile MDS ($p = 0,017$), ET ile AML ($p = 0,002$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Aynı zamanda parametrik olmayan yöntemler kullanılarak bu değerlere karşı istatistiksel açıdan önlem alınmıştır.

Tablo 4.6: *miR-29a* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
PV-Kontrol	-40,385	13,903	-2,905	,004	,055
PV-AML	55,964	12,177	4,596	0,001	0,001
PV-ET	9,200	14,782	,622	,534	1,000
PV-KML	28,684	12,913	2,221	,026	,395
PV-MDS	38,765	11,890	3,260	,001	,017
ET-Kontrol	-31,185	13,903	-2,243	,025	,373
ET-AML	-46,764	12,177	-3,841	0,001	,002
ET-KML	-19,484	12,913	-1,509	,131	1,000
ET-MDS	-29,565	11,890	-2,486	,013	,194
KML-Kontrol	-11,700	11,897	-,983	,325	1,000
KML-AML	27,280	9,824	2,777	,005	,082
KML-MDS	-10,080	9,467	-1,065	,287	1,000
MDS-Kontrol	-1,620	10,778	-,150	,881	1,000
MDS-AML	17,200	8,435	2,039	,041	,622
Kontrol-AML	15,580	11,093	1,404	,160	1,000

Şekil 4. 8: Kontrol ve hasta gruplarında *miR-29a* ifade değerleri.

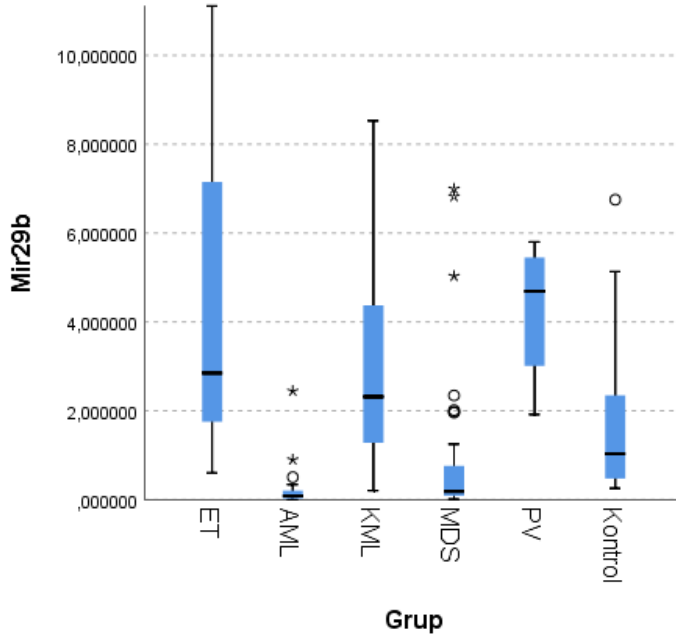
4.2.4. *miR-29b* İfade Seviyelerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

miR-29b ifade seviyesi kontrol grubuna göre KML, ET ve PV gruplarında artmış olarak bulundu. Diğer yandan AML ve MDS gruplarında ise kontrol grubuna göre *miR-29b* ifadesi azalmış olarak bulundu. Hastalıkların birbirine dönüşümü göz önüne alınarak hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla KML, ET ve PV gruplarında *miR-29b* ifadesi artmış bulundu. Son olarak ET grubuna kıyasla PV grubunda *miR-29b* ifadesi artmış bulundu (Tablo 4.7).

Çalışmada çoklu gruplar bulunduğu için hastalık grupları ve kontrol grupları ikili olarak *Kruskal Wallis* testi kullanılarak kıyaslandı. Anlamlılık tespit edilen değişkenlerde kıyaslama *Dunn-Bonferroni* metodu kullanılarak düzenlendi ve sonuçlar *box and whisker* grafiği ile görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.9). *miR-29b* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$). Bu farklılık, AML ile kontrol ($p<0,001$), KML ile AML ($p<0,001$), AML ile ET ($p<0,001$), AML ile PV ($p<0,001$), MDS ile KML ($p<0,001$), MDS ile ET ($p=0,007$), MDS ile PV ($p<0,001$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır. (Şekil 4.9).

Tablo 4.7: *miR-29b* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
AML-Kontrol	-42,920	11,190	-3,836	0,001	,002
AML-KML	-55,694	9,910	-5,620	0,001	0,001
AML-ET	61,036	12,283	4,969	0,001	0,001
AML-PV	-68,445	11,864	-5,769	0,001	0,001
AML-MDS	-19,036	8,509	-2,237	,025	,379
MDS-Kontrol	-23,885	10,872	-2,197	,028	,421
MDS-KML	36,658	9,550	3,838	0,001	,002
MDS-ET	42,000	11,994	3,502	0,001	,007
MDS-PV	-49,409	11,565	-4,272	0,001	0,001
Kontrol-KML	12,773	12,001	1,064	,287	1,000
Kontrol-ET	18,115	14,024	1,292	,196	1,000
Kontrol-PV	25,524	13,659	1,869	,062	,925
KML-ET	5,342	13,026	,410	,682	1,000
KML-PV	-12,751	12,632	-1,009	,313	1,000
ET-PV	-7,409	14,568	-,509	,611	1,000



Şekil 4. 9: Kontrol ve hasta gruplarında *miR-29b* ifade değerleri. * aykırı bir değeri, o ise uç değeri göstermektedir ve bu işaretleme sadece ortanca değerden olan uzaklığa göre çizilmiştir. Aynı zamanda parametrik olmayan yöntemler kullanılarak bu değerlere karşı istatistiksel açıdan önlem alınmıştır.

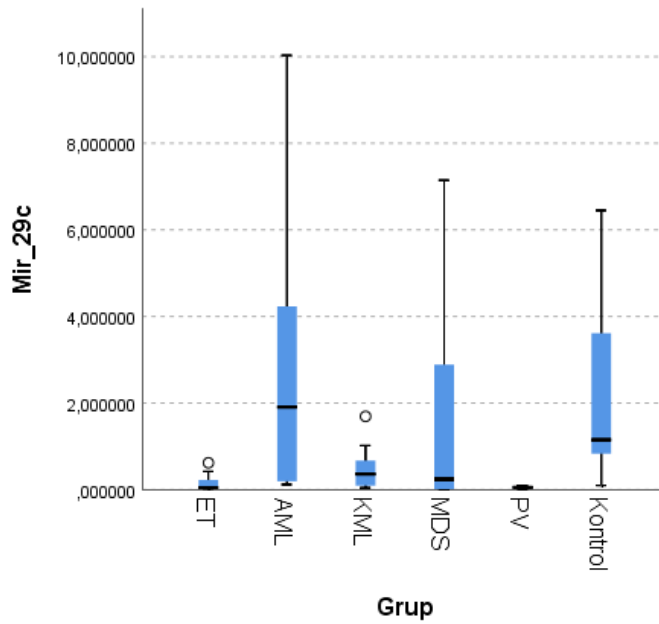
4.2.5. *miR-29c* İfade Seviyelerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

miR-29c ifade seviyesi kontrol grubuna göre KML, MDS, ET ve PV gruplarında azalmış olarak bulundu. Diğer yandan AML grubunda ise kontrol grubuna göre *miR-29c* ifadesi artmış olarak bulundu. Hastalıkların birbirine dönüşümü göz önüne alınarak hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla diğer hastalık gruplarında *miR-29c* ifadesi azalmış olarak bulundu. Son olarak MDS, ET ve PV gruplarına kıyasla KML grubunda *miR-29c* ifadesi artmış bulundu (Tablo 4.8).

Çalışmada çoklu gruplar bulunduğu için hastalık grupları ve kontrol grupları ikili olarak Kruskal Wallis testi kullanılarak kıyaslandı. Anlamlılık tespit edilen değişkenlerde kıyaslama Dunn-Bonferroni metodu kullanılarak düzenlendi ve sonuçlar box and whisker grafiği ile görsel olarak verilmiştir (Şekil 4.10). *miR-29c* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$). Bu farklılık, AML ile PV ($p < 0,001$), PV ile kontrol ($p = 0,001$), AML ile ET ($p = 0,003$), ET ile kontrol ($p = 0,014$) ve MDS ile AML ($p = 0,009$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Şekil 4.10).

Tablo 4.8: *miR-29c* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
PV-Kontrol	-53,643	13,659	-3,927	0,001	,001
PV-ET	7,182	14,568	,493	,622	1,000
PV-MDS	24,123	11,565	2,086	,037	,555
PV-KML	26,656	12,632	2,110	,035	,523
PV-AML	53,218	11,864	4,485	0,001	0,001
ET-Kontrol	-46,462	14,024	-3,313	,001	,014
ET-MDS	-16,941	11,994	-1,412	,158	1,000
ET-KML	-19,474	13,026	-1,495	,135	1,000
ET-AML	-46,036	12,283	-3,748	0,001	,003
MDS-Kontrol	-29,520	10,872	-2,715	,007	,099
MDS-KML	2,533	9,550	,265	,791	1,000
MDS-AML	29,095	8,509	3,419	,001	,009
KML-AML	26,562	9,910	2,680	,007	,110
KML-Kontrol	-26,988	12,001	-2,249	,025	,368
AML-Kontrol	-,426	11,190	-,038	,970	1,000



Şekil 4. 10: Kontrol ve hasta gruplarında *miR-29c* ifade değerleri. o uç değeri göstermektedir ve bu işaretleme sadece ortanca değerden olan uzaklığa göre çizilmiştir. Aynı zamanda parametrik olmayan yöntemler kullanılarak bu değerlere karşı istatistiksel açıdan önlem alınmıştır.

4.3. Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

Çalışmamızdaki *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifadelerindeki değişimlerin birbiri ile ilişkili olup olmadığını her grup için araştırdık. Tüm hastalık gruplarımızdaki genlerin ifadelerini beraber ve yalnız tek bir hastalık grubu için ayrı ayrı kıyasladık.

Gruplarda ayrı ayrı korelasyona bakıldığında, ET grubunda *miR-29a* ile *miR-29b* arasında orta düzeyde, pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0,648$, $p=0,043$). ET grubunda *miR-29a* ile *miR-29c* arasında güçlü düzeyde, pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,806$, $p=0,005$). ET grubunda *miR-29b* ve *miR-29c* arasında güçlü düzeyde, pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,879$, $p=0,001$). AML grubunda *DNMT3A* ile *miR-29c* arasında negatif yönde, orta düzeyde ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=-0,504$, $p=0,006$). AML grubunda *DNMT3A* ile *miR-29b* arasında negatif yönde, orta düzeyde ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=-0,384$, $p=0,044$). KML grubunda *miR-29* ile *miR-29c* arasında iyi düzeyde, pozitif ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,733$, $p<0,001$). MDS grubunda *TET2* ile *miR-29* arasında düşük, pozitif ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,391$, $p=0,022$). MDS grubunda *TET2* ile *miR-29b* arasında düşük, negatif ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=-0,387$, $p=0,024$). Kontrol grubunda *TET2* ile *DNMT3A* arasında negatif yönde, iyi düzeyde ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=-0,764$, $p=0,002$). Kontrol grubunda *miR-29* ile *miR-29c* arasında iyi düzeyde, pozitif ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,703$, $p=0,007$).

Tablo 4.9: Hasta ve kontrol grupları arasında *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*'nin korelasyon tablosu.

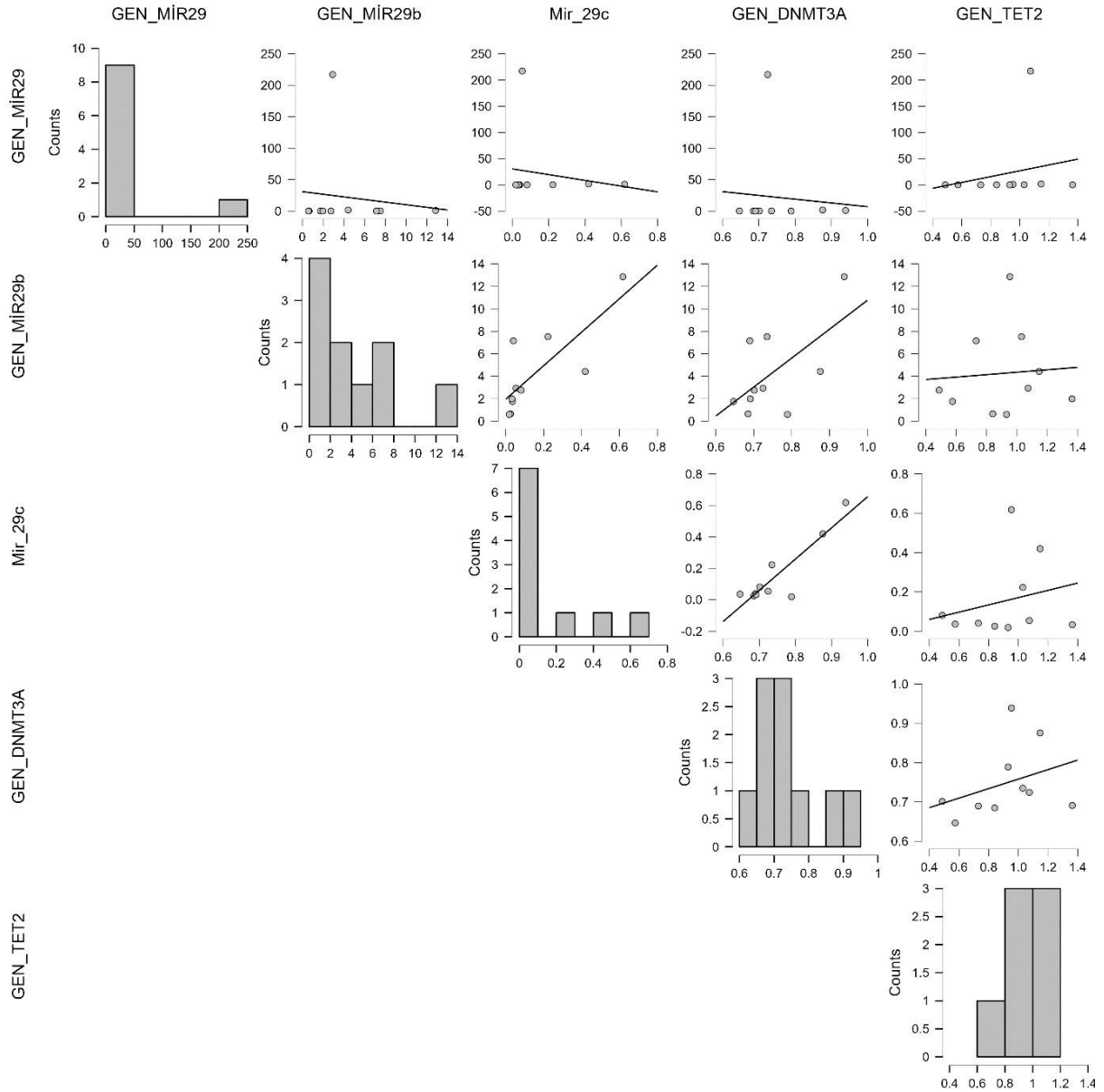
			Gen_ <i>DNMT3A</i>	Gen_ <i>TET2</i>	Gen_ <i>miR29a</i>	Gen_ <i>miR29b</i>	Gen_ <i>miR29c</i>
Spearman'ın rho'su	Gen_ <i>DNMT3A</i>	Korelasyon katsayısı	1,000	,097	,278**	-,072	,176
		Sig. (2-tailed)	.	,303	,003	,446	,059
		N	115	115	114	115	115
	Gen_ <i>TET2</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,303	.	0,001	,003	,001
		N	115	115	114	115	115
	Gen_ <i>miR29a</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,003	,000	.	0,001	,003
		N	114	114	114	114	114
	Gen_ <i>miR29b</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,446	,003	0,001	.	0,001
		N	115	115	114	115	115
	Gen_ <i>miR29c</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,059	,001	,003	0,001	.
		N	115	115	114	115	115

4.3.1. ET Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

ET grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı *spearman korelasyonu* ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.10). ET grubunda *miR-29a* ile *miR-29c* arasında ve *miR-29b* ile *miR-29c* arasında güçlü düzeyde, pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla, $r=0,806$, $p=0,005$ ve $r=0,879$, $p=0,001$). Ayrıca; *miR-29a* ile *miR-29b* arasında orta düzeyde, pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0,648$, $p=0,043$).

Tablo 4.10: ET grubunun korelasyon tablosu.

Grup				GEN_DNMT3A	GEN_TET2	GEN_MIR29	GEN_MIR29b	Mir_29c
ET	Spearman'ın rho'su	Gen_DNMT3A	Korelasyon katsayısı	1,000	,479	,394	,479	,588
			Sig. (2-tailed)	.	,162	,260	,162	,074
			N	10	10	10	10	10
		Gen_TET2	Korelasyon katsayısı	,479	1,000	,261	,236	,188
			Sig. (2-tailed)	,162	.	,467	,511	,603
			N	10	10	10	10	10
		Gen_miR-29a	Korelasyon katsayısı	,394	,261	1,000	,648*	,806**
			Sig. (2-tailed)	,260	,467	.	,043	,005
			N	10	10	10	10	10
		Gen_miR-29b	Korelasyon katsayısı	,479	,236	,648*	1,000	,879**
			Sig. (2-tailed)	,162	,511	,043	.	,001
			N	10	10	10	10	10
		Gen_miR-29c	Korelasyon katsayısı	,588	,188	,806**	,879**	1,000
			Sig. (2-tailed)	,074	,603	,005	,001	.
			N	10	10	10	10	10



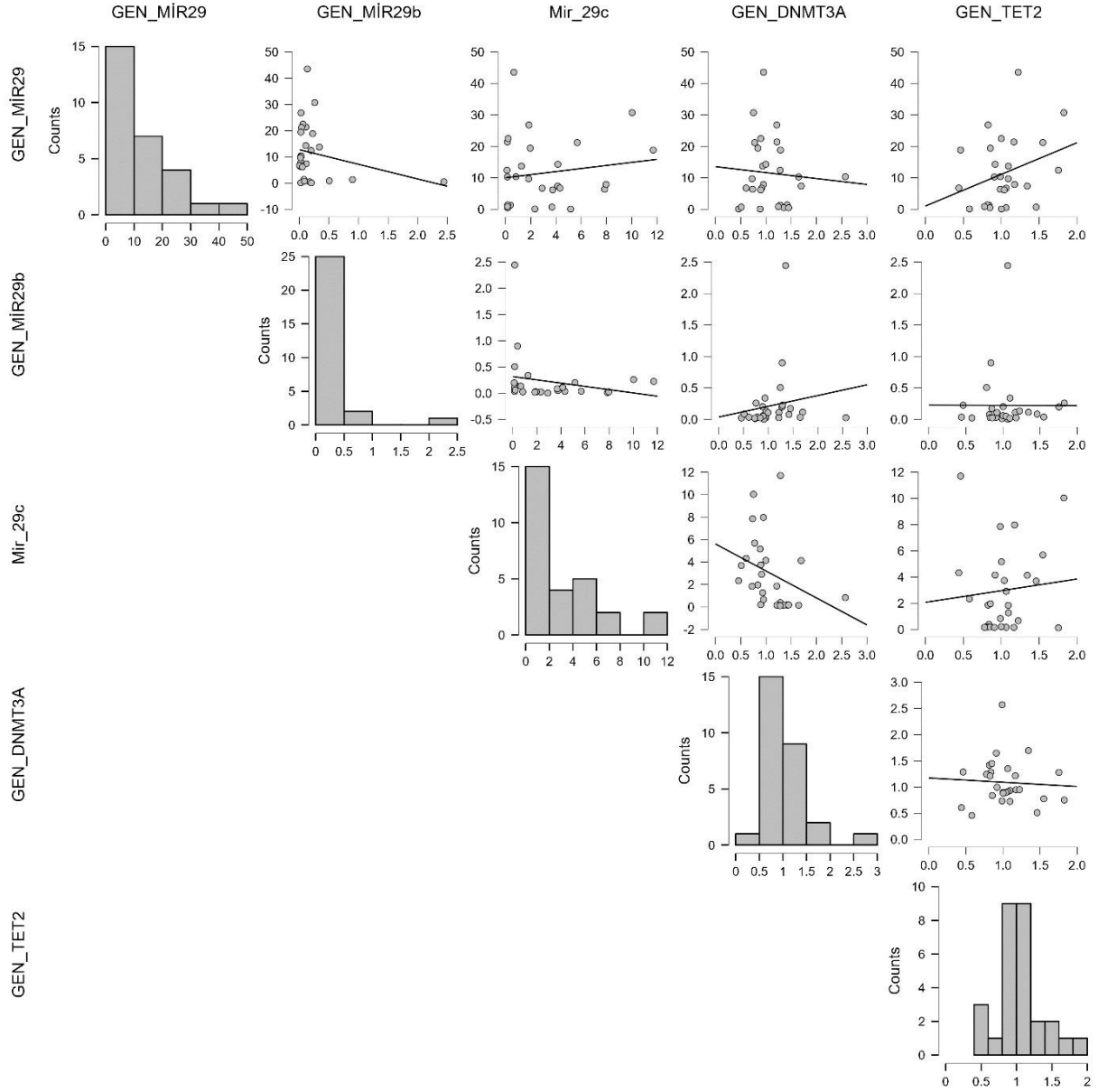
Şekil 4.11: ET Korelasyon Saçılım Grafikleri.

4.3.2. AML Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

AML grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı spearman korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.11). AML grubunda *miR-29a* ile *miR-29c* arasında pozitif ve *miR-29b* ile *miR-29c* arasında negatif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla, $r=0,68$, $p=0,729$ ve $r=-0,239$, $p=0,220$). Ayrıca; *miR-29a* ile *miR-29b* arasında pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0,066$, $p=0,740$).

Tablo 4.11: AML grubunun korelasyon tablosu.

Grup				GEN_DNMT3A	GEN_TET2	GEN_MIR29	GEN_MIR29b	Mir_29c
AML	Spearman'ın rho'su	Gen_DNMT3A	Korelasyon katsayısı	1,000	-,136	,010	,384*	-,504**
			Sig. (2-tailed)	.	,489	,960	,044	,006
			N	28	28	28	28	28
		Gen_TET2	Korelasyon katsayısı	-,136	1,000	,305	,097	,086
			Sig. (2-tailed)	,489	.	,114	,622	,662
			N	28	28	28	28	28
		Gen_miR-29a	Korelasyon katsayısı	,010	,305	1,000	-,066	,068
			Sig. (2-tailed)	,960	,114	.	,740	,729
			N	28	28	28	28	28
		Gen_miR-29b	Korelasyon katsayısı	,384*	,097	-,066	1,000	-,239
			Sig. (2-tailed)	,044	,622	,740	.	,220
			N	28	28	28	28	28
		Gen_miR-29c	Korelasyon katsayısı	-,504**	,086	,068	-,239	1,000
			Sig. (2-tailed)	,006	,662	,729	,220	.
			N	28	28	28	28	28



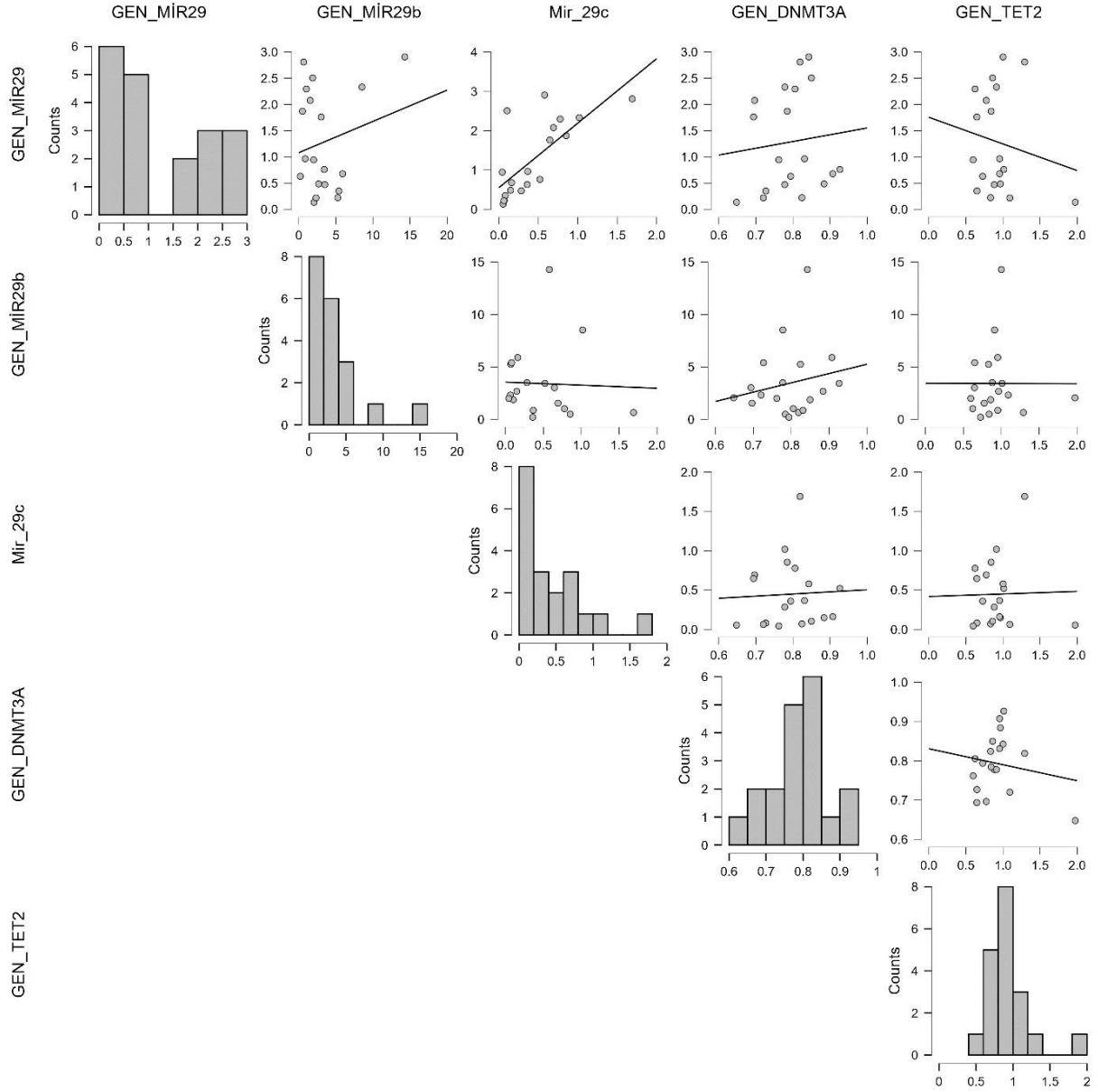
Şekil 4.12: AML Korelasyon Saçılım Grafikleri.

4.3.3. KML Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

KML grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı spearman korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.12). KML grubunda *miR-29a* ile *miR-29c* arasında çok güçlü, pozitif yönde ve *miR-29b* ile *miR-29c* arasında negatif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla, $r=0,733$, $p=0,000$ ve $r=-0,198$, $p=0,416$). Ayrıca; *miR-29a* ile *miR-29b* arasında negatif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=-0,160$, $p=0,514$).

Tablo 4.12: KML grubunun korelasyonu tablosu.

Grup				GEN_DNMT3A	GEN_TET2	GEN_MIR29	GEN_MIR29b	Mir_29c
KML	Spearman'ın rho'su	Gen_DNMT3A	Korelasyon katsayısı	1,000	,272	,268	,119	,123
			Sig. (2-tailed)	.	,260	,267	,627	,616
			N	19	19	19	19	19
		Gen_TET2	Korelasyon katsayısı	,272	1,000	-,098	,139	-,007
			Sig. (2-tailed)	,260	.	,689	,571	,977
			N	19	19	19	19	19
		Gen_miR-29a	Korelasyon katsayısı	,268	-,098	1,000	-,160	,733**
			Sig. (2-tailed)	,267	,689	.	,514	0,001
			N	19	19	19	19	19
		Gen_miR-29b	Korelasyon katsayısı	,119	,139	-,160	1,000	-,198
			Sig. (2-tailed)	,627	,571	,514	.	,416
			N	19	19	19	19	19
		Gen_miR-29c	Korelasyon katsayısı	,123	-,007	,733**	-,198	1,000
			Sig. (2-tailed)	,616	,977	0,001	,416	.
			N	19	19	19	19	19



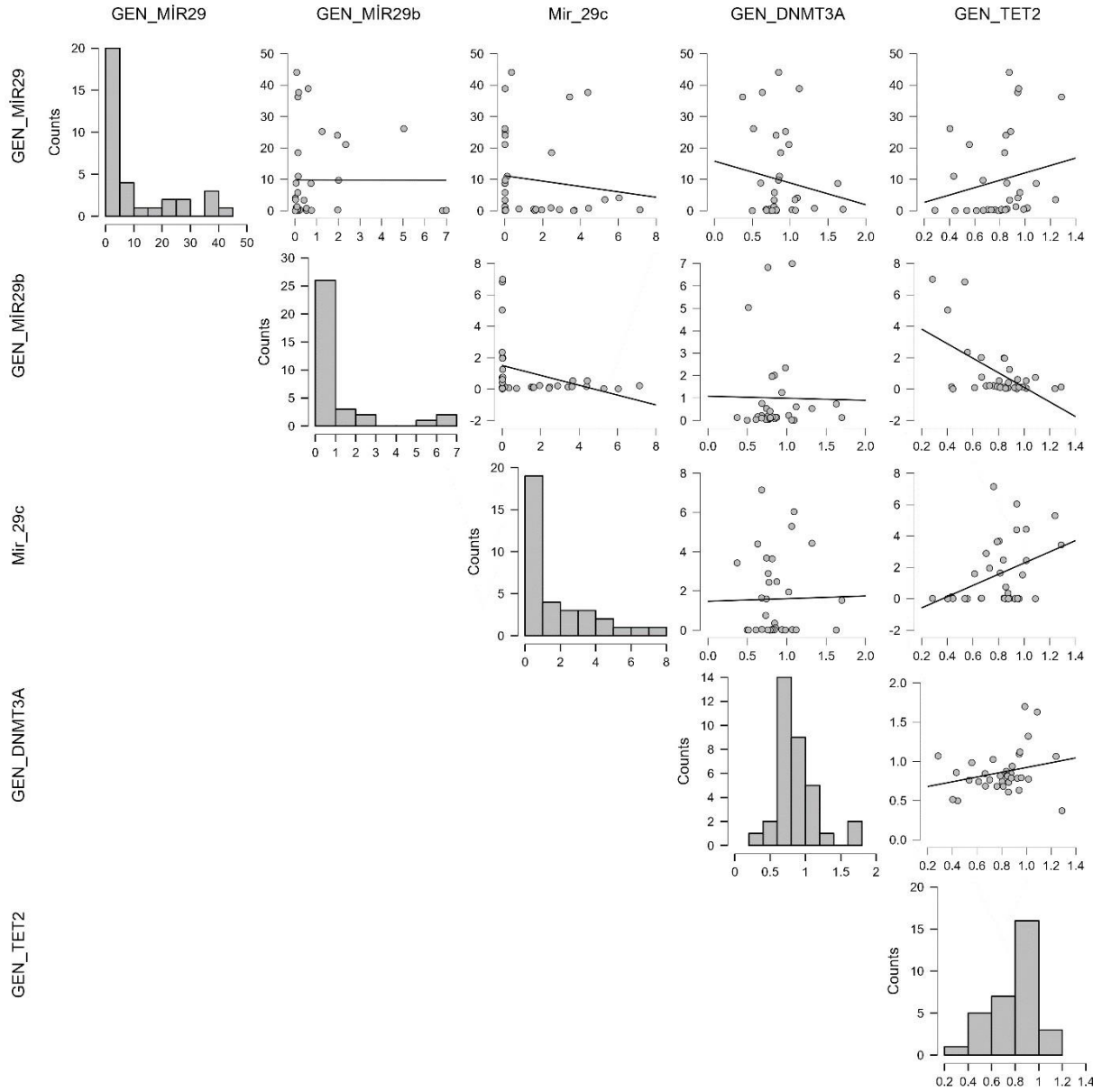
Şekil 4.13: KML Korelasyon Saçılım Grafikleri.

4.3.4. MDS Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

MDS grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı spearman korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.13). MDS grubunda *miR-29a* ile *miR-29c* arasında ve *miR-29b* ile *miR-29c* arasında negatif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla, $r=-0,169$, $p=0,341$ ve $r=-0,336$, $p=0,052$). Ayrıca; *miR-29a* ile *miR-29b* arasında pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0,042$, $p=0,815$).

Tablo 4.13: MDS grubunun korelasyonu tablosu.

Grup				GEN_DNMT3A	GEN_TET2	GEN_MIR29	GEN_MIR29b	Mir_29c
MDS	Spearman'ın rho'su	Gen_DNMT3A	Korelasyon katsayısı	1,000	,273	,144	,194	-,004
			Sig. (2-tailed)	.	,119	,416	,271	,983
			N	34	34	34	34	34
		Gen_TET2	Korelasyon katsayısı	,273	1,000	,391*	-,387*	,208
			Sig. (2-tailed)	,119	.	,022	,024	,237
			N	34	34	34	34	34
		Gen_miR-29a	Korelasyon katsayısı	,144	,391*	1,000	,042	-,169
			Sig. (2-tailed)	,416	,022	.	,815	,341
			N	34	34	34	34	34
		Gen_miR-29b	Korelasyon katsayısı	,194	-,387*	,042	1,000	-,336
			Sig. (2-tailed)	,271	,024	,815	.	,052
			N	34	34	34	34	34
		Gen_miR-29c	Korelasyon katsayısı	-,004	,208	-,169	-,336	1,000
			Sig. (2-tailed)	,983	,237	,341	,052	.
			N	34	34	34	34	34



Şekil 4.14: MDS Korelasyon Saçılım Grafikleri.

4.3.5. PV Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

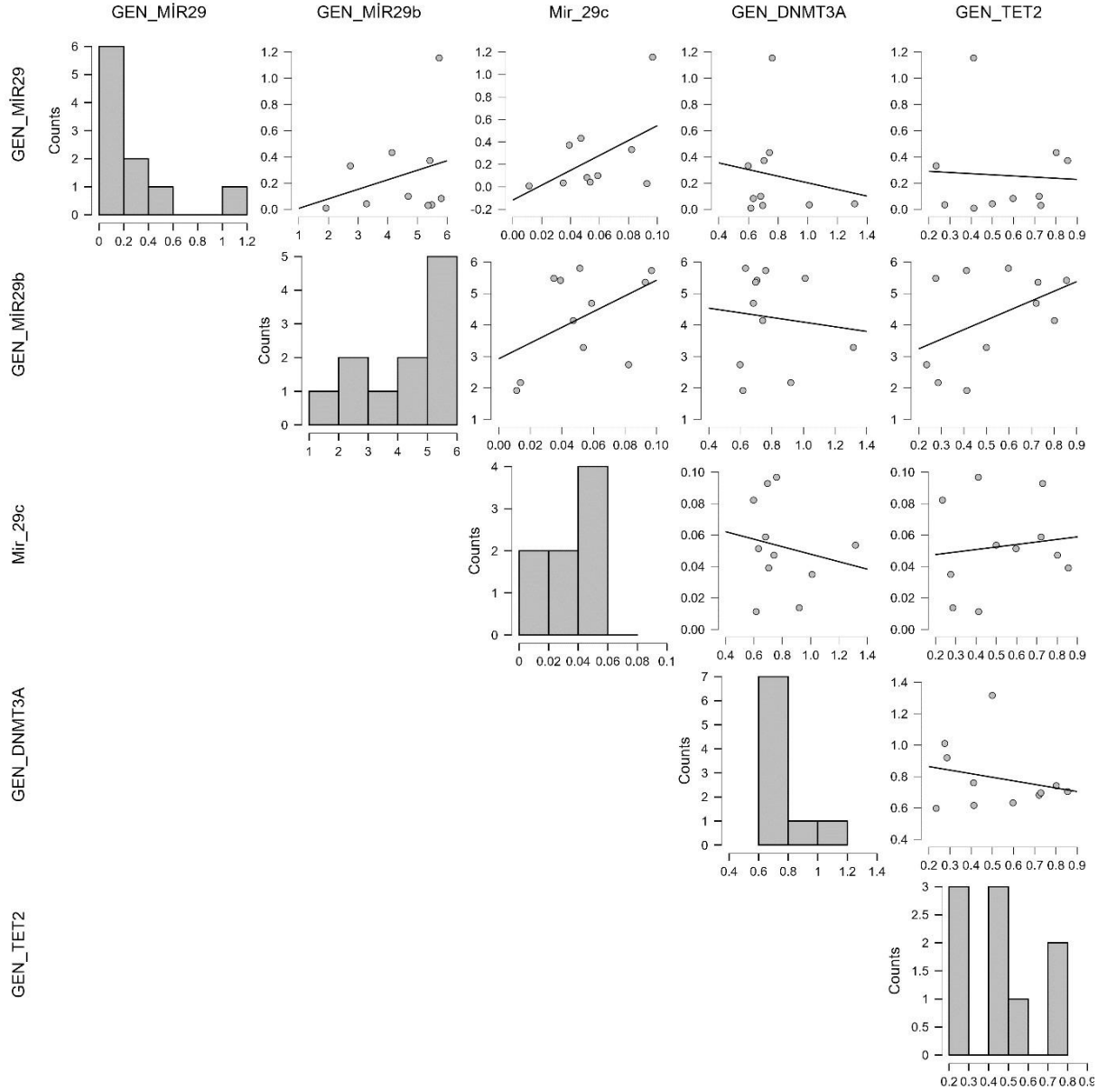
PV grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı spearman korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.14). PV grubunda *miR-29a* ile *miR-29c* arasında ve *miR-29b* ile *miR-29c* arasında pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu (sırasıyla, $r=0,358$, $p=0,310$ ve $r=0,382$, $p=0,247$). Ayrıca; *miR-29a* ile *miR-29b* arasında pozitif yönde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0,273$, $p=0,446$).

4.3.6. Kontrol Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

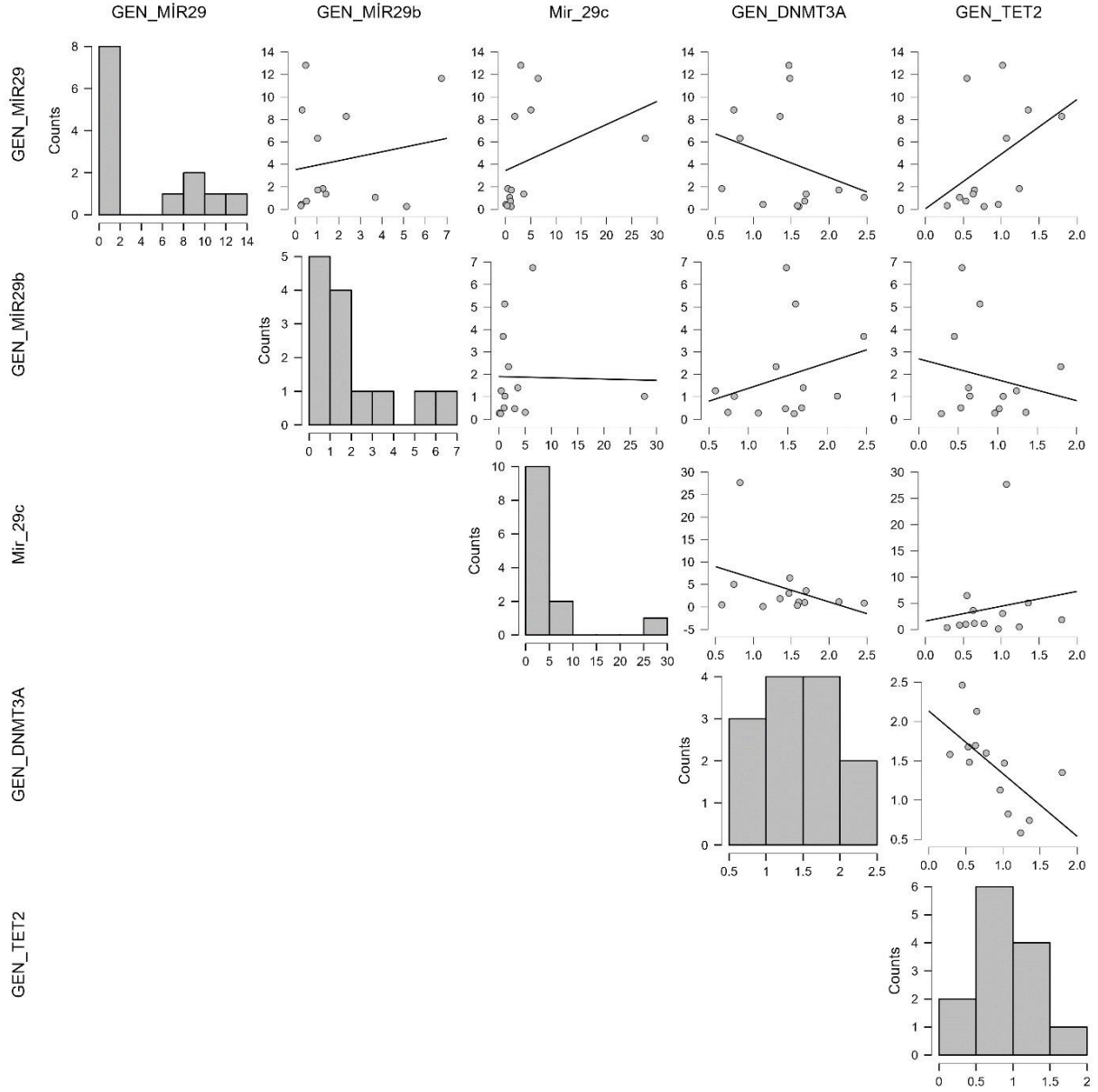
Kontrol grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı spearman korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.14). Kontrol grubunda *TET2* ve *DNMT3A* arasında negatif yönde iyi düzeyde ve anlamlı bir ilişki vardır ($r=0,764$, $p=0,002$). Ayrıca; *miR-29a* ile *miR-29c* arasında pozitif yönde iyi düzeyde ve anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0,703$, $p=0,007$).

Tablo 4.14: PV ve Kontrol grubunun korelasyonu tablosu.

Grup				GEN_DNMT3A	GEN_TET2	GEN_MiR29	GEN_MiR29b	Mir_29c
PV	Spearman'in rho'su	Gen_DNMT3A	Korelasyon katsayısı	1,000	-,055	,164	,145	-,118
			Sig. (2-tailed)	.	,873	,651	,670	,729
			N	11	11	10	11	11
		Gen_TET2	Korelasyon katsayısı	-,055	1,000	,164	,236	,055
			Sig. (2-tailed)	,873	.	,651	,484	,873
			N	11	11	10	11	11
		Gen_miR-29a	Korelasyon katsayısı	,164	,164	1,000	,273	,358
			Sig. (2-tailed)	,651	,651	.	,446	,310
			N	10	10	10	10	10
		Gen_miR-29b	Korelasyon katsayısı	,145	,236	,273	1,000	,382
			Sig. (2-tailed)	,670	,484	,446	.	,247
			N	11	11	10	11	11
		Gen_miR-29c	Korelasyon katsayısı	-,118	,055	,358	,382	1,000
			Sig. (2-tailed)	,729	,873	,310	,247	.
			N	11	11	10	11	11
Grup				GEN_DNMT3A	GEN_TET2	GEN_MiR29	GEN_MiR29b	Mir_29c
Kontrol	Spearman'in rho'su	Gen_DNMT3A	Korelasyon katsayısı	1,000	-,764**	-,418	,330	-,137
			Sig. (2-tailed)	.	,002	,156	,271	,655
			N	13	13	13	13	13
		Gen_TET2	Korelasyon katsayısı	-,764**	1,000	,522	-,055	,319
			Sig. (2-tailed)	,002	.	,067	,859	,289
			N	13	13	13	13	13
		Gen_miR-29a	Korelasyon katsayısı	-,418	,522	1,000	,110	,703**
			Sig. (2-tailed)	,156	,067	.	,721	,007
			N	13	13	13	13	13
		Gen_miR-29b	Korelasyon katsayısı	,330	-,055	,110	1,000	,297
			Sig. (2-tailed)	,271	,859	,721	.	,325
			N	13	13	13	13	13
		Gen_miR-29c	Korelasyon katsayısı	-,137	,319	,703**	,297	1,000
			Sig. (2-tailed)	,655	,289	,007	,325	.
			N	13	13	13	13	13



Şekil 4.15: PV Korelasyon Saçılım Grafikleri.



Şekil 4.16: Kontrol Grubu Korelasyon Saçılım Grafikleri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Miyeloid maligniteler miyeloid hücrelerinde görülen genetik anormallikler ve mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkan bir kan hastalığıdır. Hastalığın tedavisinde genellikle hematopoetik kök hücre transplantasyonu kullanılmasına rağmen bu tedavi yöntemi tam olarak etkili bir yöntem değildir. Hastalığın zamanla nüks etmesi mümkündür.

Miyeloid maligniteler için birçok çalışma mevcuttur ve yapılan çalışmalar sayesinde bazı sitogenetik anormalliklerle birlikte birden fazla genin *driver/non-driver* mutasyona uğradığı, aynı zamanda miRNA'ların hematopoetik kök hücrede birçok geni kontrol ettiği ve ilgili genlerin ifade seviyesini etkilediği bu yüzden malignite gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Bu mutasyonlar hastalık alt tipine göre ve her bir hastada farklılık göstermektedir. Hastalık tedavisi için birçok ilaç mevcuttur, fakat hastalarda zamanla ilaca karşı direnç artmaktadır. Bu yüzden yeni ilaçlar geliştirilmektedir ama daha etkili bir tedavi ve hastalıkta erken tanı için biyobelirteçlere ihtiyaç vardır [86-90]. Çalışmamızda, *TET2*, *DNMT3A* genleri ve bu genleri hedefleyen ortak miR'lerin (miR-29a-3p, 29b-3p ve 29c-3p) ifade düzeyindeki farklılıklarını araştırdık. Bu araştırma da amacımız; *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin ifade düzeylerinin ne derece değişime uğradığını saptamak ve klinik anlamda bu değişimin miyeloid malignitelerde birer biyobelirteç olup olamayacağına dair literatüre katkı sunmaktır. Aynı zamanda, her iki geni de en yüksek skorla (> 97) hedefleyen, post translasyonel kontrolleri sağlayan miR'lerin ifade düzeylerinin etkisini de araştırmak amaçlanmıştır. Bulduğumuz sonuçlar doğrultusunda hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir veri sunduğumuzu düşünmekteyiz.

Çalışmamıza, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Bölümü Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran, 28 AML, 19 KML, 34 MDS, 11 PV ve 10 ET'den oluşan 102 gönüllü hasta ve kardiyovasküler cerrahi sırasında sternumlarının kesilmesiyle operasyon alanına sızan ve herhangi bir tanısı ya da tedavi değeri olmayan, cerrah tarafından aspire edilerek atılan kemik iliği örneğinden oluşan 13 gönüllü kontrol olmak üzere toplam 115 bireyin kemik iliği örneği dahil edildi. Miyeloid maligniteli bu hastalarda *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin ifade düzeylerinin nasıl değiştiği ve ayrıca bu değişime, ilgili genleri hedefleyen miR'lerin, nasıl katkısı olduğu araştırıldı. Çalışma grubunu oluşturan bireylerin %44,3'ü kadın, %55,7'si erkek bireylerdir. Cinsiyetlerin dağılımı bakımından gruplar arasındaki farklılık bulunmamıştır ($p=0,142$). Kadınlarda yaş ortalaması 63,15, erkeklerde 61,47 olarak belirlendi. Yaş değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ($p=0,071$). Araştırmacılar, genel yaşa göre standardize edilmiş (Avrupa popülasyonunda) miyeloid malignite insidansını 100.000'de 6.8 olarak hesaplamıştır. Bu insidans kadınlarda 7,9/100.000, erkeklerde 9,3/100.000 olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada 25-64 yaş aralığındaki insidansı 5,1/100.000, 65+ yaş grubundaki insidansı ise 35,3/100.000 olarak belirtmişlerdir [91]. Başka bir çalışmada Miyeloid malignite insidansının kadınlarda 15,07/100.000, erkeklerde 25,14/100.000 olduğu gösterilmiştir [92]. Türkiye için henüz bildirilmiş bir insidans bulunmamaktadır ve kıyaslama yapılan popülasyon ile çalıştığımız popülasyonun farklı olduğu ihmal edilmemelidir. Bizim çalışmamızda da erkek hasta oranının (%55,7) kadın hasta oranından (%44,3) yüksek olduğu bulundu. Bu sonucumuz literatürü desteklemektedir.

Çalışmamızda miyeloid malignite hastalarında *DNMT3A* geninde ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Bu farklılık, ET ile AML ($p=0,042$), ET ile kontrol ($p=0,002$), PV ile kontrol ($p=0,004$), KML ile kontrol ($p=0,012$) ve MDS ile kontrol ($p=0,014$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Na Lin ve ark. bir çalışmalarında DNMT3A varyantlarının alternatif eklenmesinin ifade seviyelerini değerlendirmeyi ve bunların AML'deki rollerini araştırmayı amaçlamıştır. DNMT3A

varyantlarının gen ifadesini, hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini ölçerek değerlendirmişlerdir. Ek olarak, AML hastalarında DNMT3A varyantlarının ifadesini değerlendirmişlerdir. AML hücre hatlarında DNMT3A1 ve DNMT3A2V'nin baskın olduğu bulunan dört DNMT3A varyantı tanımlamışlardır. Ayrıca, DNMT3A2V aşırı ifadesinin hücre proliferasyonunu geciktirdiğini, DNMT3A2V R882H mutasyonu ise hücre çoğalmasını desteklediğini vurgulamışlardır. Ayrıca, yeni teşhis edilen AML hastalarında ve malign olmayan hematolojik hastalığı olan kontrollerde DNMT3A1 ve DNMT3A2V saptandığını ve DNMT3A2V'nin, AML hastalarında önemli ölçüde up regüle edildiğini belirtmişlerdir [93]. Başka bir çalışmada da, Samantha Bruno ve ark. *DNMT3A* protein ifadesindeki değişikliklerin CpG metilasyonunda gözlenen değişikliklerden sorumlu olduğunu söylemektedirler [94]. Biz çalışmamızda; miyeloid malignite gruplarında *DNMT3A* genindeki ifade seviyesi azalmış olarak bulunmuştur. AML grubunda, diğer gruplara kıyasla daha fazla bir ifade düzeyi söz konusudur. Bu durumun *DNMT3A* varyantlarının olmasından ve AML alt tiplerinin bulunmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda *DNMT3A* mutasyonuna ve protein düzeyinde varyant proteinlerin varlığına bakmamış olmamız yorumlamamızı güçleştirmektedir.

Keqin Kathy Li ve ark. *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2* genlerinde meydana gelen mutasyonların insidansının, hematolojik malignitelerde dikkate değer olduğunu, bunun da DNA metilasyonu ve/veya histon modülasyon profillerinde değişikliklere ve ardından gen ifadesinde değişikliklere neden olduğunu vurgulamaktadır [95]. *DNMT3A*'nın somatik mutasyonları, AML hastalarının yaklaşık %20'sinde meydana gelmektedir. Çoğunlukla, baskın bir negatif etki sergileyen ve yüksek miyeloblast sayısı, ileri yaş ve kötü prognoz ile ilişkili olan, R882 kodonundaki bir sıcak nokta bölgesini hedef alan heterozigot missense mutasyonlardan oluşurlar. İnsersiyonlar veya tek nükleotit delesyonları gibi diğer mutasyon türleri de *DNMT3A* genini daha düşük sıklıkta da olsa etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar CpG adalarında protein stabilitesi ve DNA metilasyon durumunun analizi yoluyla, yeni nesil dizileme (NGS) tarafından tanımlanan iki *DNMT3A* gen mutasyonunu karakterize etmeyi amaçlamışlardır. İlk mutasyonu, erken STOP kodonuna neden olan ekzon 20'de *DNMT3A*'nın tek nükleotid varyantı olarak belirlemişlerdir. İkinci mutasyon, *DNMT3A*'nın 22 ekzonuna 35 nükleotidin yeni bir insersiyonu olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada yapılan protein ve metilasyon analizleri, bu mutasyonların *DNMT3A* ifadesi ve işlevinde azalma ile sonuçlandığını göstermiştir ve *DNMT3A* mutasyonlarının, miyeloid malignitelerde oldukça etkili olduğu vurgulanmaktadır [94].

Çalışmamızda *TET2* geninde ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulduk ($p < 0,001$). Bu farklılık, PV ile KML ($p = 0,016$), ET ile PV ($p = 0,030$), PV ile AML ($p < 0,001$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

TET2, DNA metilasyonunun kritik bir düzenleyicisidir. *TET2*'deki genomik değişiklikler, 5-hmC seviyelerinde değişikliklere ve kök hücrelerin bakımı ve proliferasyonunda down stream durumuna yol açmaktadır. Hematolojik neoplazmlarda mutasyonlar zenginleşmekle birlikte, solid tümörlerde de *TET2* fonksiyon kaybı bulunmaktadır. Araştırmacılar bebek AML'sinde yaptıkları çalışmada TET enzim ailesini, t(10;11) translokasyon kırılma noktasından klonlamıştır. Sonraki genomik analizlerle somatik mutasyonları ortaya çıkarmışlardır ve hematolojik neoplazmlarda zenginleştirilmiş bir dizi malignite boyunca TET ailesi üyelerinin ifadesini bastırdığını gözlemlemişlerdir. İlginç bir şekilde, *TET2* mutasyonlarına sahip AML hastalarının çoğu, wild-type allel ifadesini korurken, hastaların sadece %10'u bialelik mutasyonlara sahip olduğunu görmüşlerdir. *TET2*'nin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, bu veriler bir tümör baskılayıcı rolü ve *TET2* mutantlarında potansiyel olarak haplo yetmezlik işlev kaybı rolünü düşündürmektedir [96]. Biz çalışmamızda; miyeloid malignite gruplarında *TET2* genindeki ifade seviyesini PV grubunda azalmış, ET, KML, AML ve MDS grubunda ise artmış olarak bulduk. Bu durumun *TET2* fonksiyon kaybının malignitelerde değişkenlik gösteren, sitogenetik

anormallik ve *TET2* geninde meydana gelen mutasyon sıklıklarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda *TET2* gen mutasyonuna bakmamış olmamız yorumlamamızı güçleştirmektedir.

TET gen ailesinin rolü hücre gelişimi sırasında çok önemli olduğundan, genetik lezyonlar veya değişen gen ifadesinden kaynaklanan herhangi bir bozulma, hücrelerin normal kaderini etkileyebilir. Carmelo Gurnari ve ark. *TET* ailesi proteinlerinin ve bunun bir sonucu olarak 5-hmC'nin yüksek düzeyde ifadesinin, embriyonik kök hücreler için önemli olduğunu, hücre kaderini ve gelişimini belirlediğini vurgulamaktadır. Bu nedenle, *TET2* gen mutasyonlarının temel rolü, AML de dahil olmak üzere miyeloid bozukluklardaki yüksek sıklıklarıyla vurgulanırken, homolog *TET1/TET3* genlerinde moleküler lezyonların olmaması, muhtemelen, belirgin bir dokuya özgü gen ifadesi ve bunların dengesizliklerinden kaynaklanan spesifik metabolik sonuçlardaki farklılıklar ile açıklanabileceğini söylemektedirler. Önemli olarak, *TET2* geninin düşük ifade seviyeleri, mutasyonlardan bağımsızda olabilmektedir. Gerçekten de, *TET2* geninde nadiren mutasyona uğradığı bilinen bir popülasyon olan pediatrik MDS vakalarında *TET2* gen ifadesi ve 5-hmC seviyelerinin de azaldığını bulmuşlardır [97]. Biz çalışmamızda MDS gruplarında *TET2* ifade seviyesini artmış olarak bulduk. Bu durum, *TET2*'nin tek başına miyeloid maligniteye neden olamayacağından ve MDS grubundaki hasta sayımızın yetersiz olabileceğinden kaynaklanan bir sonuç olduğunu düşündürmektedir.

Huang and Rao, *TET2* genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları veya delesyonlarının, çok çeşitli miyeloid ve lenfoid malignitelerde tekrarlandığını ve Cimmino ve ark., *TET1* promotörünün hipermetilasyonunun, B hücreli lenfomada ekspresyonunda bir azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir. Ayrıca Huang and Rao, *TET* proteinlerinin ve/veya modülatörlerinin ifadesinin ve işlevinin, çok çeşitli kanserlerde sıklıkla düzensiz olduğunu ve genomdaki 5mC oksidasyonunu önemli ölçüde bozduğunu da vurgulamaktadırlar [98].

MDS patogenezinde önemli rol oynayan genetik kusurların (sitogenetik anormallikler, gen mutasyonları gibi) yetersiz gen ifadesine neden olduğu söylenmektedir. Kromozomal anormallikler, somatik mutasyonlar, kopya sayısı değişiklikleri ve anormal gen ifadesi dahil olmak üzere sıklıkla AML'ye ilerleyen MDS'nin moleküler patogeneze bakıldığında, DNA metilasyonunda görev alan *DNMT3A* ve *TET2* genlerinin sıklıkla mutasyona uğradığı görülmektedir. Bu genler dışında mutasyona uğrayan *IDH1*, *IDH2* genleri, spliceosome mekanizmasında görev alan *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* genleri, histon modifikasyonunda görev alan *EZH2*, *ASXL1* genleri ve hücre döngüsü kontrolünde görev alan *TP53* genide örnek verilebilir [99].

Araştırmacılar, somatik bir mutasyonun (örneğin *SF3B1*) tek başına klinik bir fenotipe neden olabilir gibi görüldüğünü ama aslında bir driver mutasyonun (örneğin *TET2*) hematolojik belirtiler olmaksızın klonal hematopoezi belirleyebileceğini söylemektedirler. *CSF3R*'de nonsense mutasyonların edinilmesi, şiddetli konjenital nötropenisi olan hastalarda MDS/AML'ye ilerleme ile ilişkili olduğunu daha önceki çalışmalarda bulmuşlardır. Aynı zamanda, KNL'li hastaların yaklaşık %90'ında ve aKML'li hastaların yaklaşık %40'ında *CSF3R*'de aktive edici somatik mutasyonlar tespit etmişlerdir. Gotlib ve ark., KNL ve aKML örtüşen neoplazmlar olduğunu düşünmektedirler ve KNL'nin patogenezi esas olarak *CSF3R* mutasyonu ile karakterize edilse de, aKML'nin patogenezinin çok faktörlü olduğunu öne sürmektedirler [100].

Araştırmacılar, aKML'de tekrarlayan mutasyona uğramış olarak tanımlanan ilk geni, vakaların üçte birinde meydana gelen ve daha kötü bir prognozla ilişkili olan *SETBP1* geni olarak belirlemişlerdir. Ancak bu gendeki mutasyonlar aKML'ye özgü değildir ve ayrıca MDS/MPN, KML ve KNL'li hastaların bir alt grubunda da mevcuttu. *SETBP1* mutasyonlarının, *ASXL1* ve *CBL* mutasyonları ile güçlü bir ilişki gösterdiği ve *JAK2* ve *TET2* mutasyonlarını karşılıklı olarak dışladığı belirtilmektedir. Ek çalışmalar, *SETBP1* ve *ETNK1*'deki tekrarlayan mutasyonların aKML ile ilişkisini doğrulamaktadır ve araştırmacılar

aKML'de en sık mutasyona uğramış genleri *ASXL1*, *NRAS*, *SETBP1*, *SRSF2* ve *TET2* olarak belirlemiştir. Yakın zamanda aKML vakalarının %69'unun *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *EZH2* ve/veya *ASXL1* epigenetik değiştirici genlerinde en az bir mutasyon barındırdığını göstermişlerdir [101].

Kesin mekanizma tam olarak anlaşılmamakla birlikte, *TET2* ve *DNMT3A*, farklılaşmanın yanı sıra HKH özelliklerinde yer alan genlerin ifadesini kontrol eder. Araştırmacılar, *DNMT3A* mutasyonlarının, MPN'lerde (%5-10) *TET2* mutasyonlarından daha az sıklıkta görüldüğünü ve vakaların çoğunda *JAK2V617F* veya *MPL* mutasyonlarından önce geldiğini söylemektedir [102]. MPN'lerde lösemik dönüşüm ile ilişkili moleküler olaylar yüksek verimli dizileme teknikleri ile son yıllarda büyük ölçüde geliştirilmiştir. Yakın tarihli bir çalışmada, 143 MPN hastasından alınan seri numuneleri yeni nesil dizileme yoluyla analiz edilmiş ve çoğu mutasyonun MPN teşhisinde zaten mevcut olduğu ve takip sırasında sadece çok az ek mutasyon elde edildiğini göstermişlerdir (*FLT3*, *NPM1* ve *DNMT3A* mutasyonları baskındır ve sıklıkla *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1* ve *TP53*'teki mutasyonlarla ilişkilidir) [103]. Hematolojik malignitelerde meydana gelen sitogenetik anormallik ve gen mutasyonları sonucunda genlerin ifade seviyelerindeki artış ya da azalış literatürde bahsedilmektedir. Bu nedenle, bulmuş olduğumuz *DNMT3A* ifadesindeki azalma ve *TET2* ifade seviyesinin maligniteler arasındaki değişkenliğin literatürdeki bu durum ile benzer olduğunu düşünmekteyiz. Fakat gen mutasyonlarına bakmamış olmamız yorumlamamızı güçleştirmektedir. Literatürde de belirtildiği gibi, miRNA'lar DNA metilasyonunda önemli rol oynamaktadır ve *DNMT3A* ve *TET2* ifadelerindeki düzensizliğe neden olabilecek çok sayıda miRNA mevcuttur. Bu yüzden, miyeloid malignitelerde miRNA ifade seviyelerini araştırmak için, *DNMT3A* ve *TET2* genini en çok skorla hedefleyen miR-29 ailesini seçtik.

Çalışmamızda *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*'nin ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,001$). Bu farklılık *miR-29a*'da; PV İLE MDS ($p=0,017$), ET ile AML ($p=0,002$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır. *miR-29b*'de; AML ile Kontrol ($p=0,002$), KML ile AML ($p<0,001$), AML ile ET ($p<0,001$), AML ile PV ($p<0,001$), MDS ile KML ($p=0,002$), MDS ile ET ($p=0,007$), MDS ile PV ($p<0,001$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır. *miR-29c*'de ise; AML ile PV ($p<0,001$), PV ile Kontrol ($p=0,001$), AML ile ET ($p=0,003$), ET ile Kontrol ($p=0,014$) ve MDS ile AML ($p=0,009$) grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Birçok çalışma, protein kodlayan genlerin ifadesinin düzensizliklerinin altında yatan mekanizmalar yoluyla insan malignitelerinde miRNA ifadesinin düzensiz olduğunu göstermiştir. miRNA'lar, gen ifadesinin düzenlenmesinde aktif katılımcılardır; sonuç olarak, malignitelerin gelişimi ve ilerlemesi gibi çeşitli biyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer alırlar. miRNA'ların ifadesindeki değişiklik, malignitelerde ortak bir özelliktir. Son zamanlarda, araştırmacılar, promotör DNA metilasyon değişikliğinin, kanserde miRNA düzensizliğinin çok önemli bir nedeni olduğunu ortaya çıkardılar. Bununla birlikte, bazı çalışmaların sonuçları ile ilgili olarak, *DNMT3A*'nın düşük ifadesi, tümör progresyonunun artması ve hastaların zayıf sağkalımı ile ilişkilidir; buna göre çeşitli miRNA'lar bu geni hedefleyebilir ve bu nedenle kanserde bu epimiRNA'ların aşağı regülasyonu tahmin edilebilir. miR-29 ailesi (a, b ve c), *DNMT3A*'yı hedefleyen ve düzenleyen epimiRNA'lardan biridir. AML üzerinde yapılan bir deney, miR-29b'nin DNA metilasyonunu azaltabileceğini ve *DNMT3A* ve *DNMT3B*'nin doğrudan down regülasyonu yoluyla *p15* ve *ESR1* ifadesini artırabileceğini göstermişlerdir. AML üzerine yapılan bir çalışma, *TET2*'nin miR-22 tarafından hedeflendiğini ve bu genin ifadesi ile AML'de miR-22 arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Salati et al. KML lösemik kök hücrelerde miR-29a'nın yukarı regülasyonunun, *TET2* geninin doğrudan hedeflenmesi yoluyla tirozin kinaz inhibitörleri direncine yol açtığını göstermiştir. Bu nedenle, bu miRNA'nın ifadesini geri yüklemek, Imatinib mesilat gibi TKI'ye duyarlılığı artırabileceği söylenmektedir [100]. Bizim çalışmamızda da; AML grubunda, *DNMT3A* ile miR-29c ve miR-29b arasında orta düzeyde negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir

sonuç bulunmuştur. KML grubunda ise, miR-29a ve miR-29c arasında iyi düzeyde pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmaktadır. Aynı zamanda miR-29a ifadesi kontrol grubuna kıyasla; AML ve MDS'de artmış, KML, ET ve PV'de azalmış olarak, miR-29b ifadesi; AML ve MDS'de azalmış, KML, ET ve PV'de artmış, miR-29c ifadesi; AML'de artmış, KML, MDS, ET ve PV'de azalmış olarak bulunmuştur. Literatürde de farklılık gösteren miR-29 ifade sonuçları tartışmalı olduğundan, bu farklılığın hastalık alt tiplerinden ve hedefledikleri genlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

miR-29 ailesi dışında malignite gelişiminde rol oynayan bir çok miRNA'lar mevcuttur. Araştırmacılar, 13q- KLL hastalarında, miR-15a/16-1 eksikliğinin, pri-miR-15b ve miR-15b ifadesini modüle ederek telafi edildiğini ortaya çıkarmıştır. Lovat ve ark., Bu deneylerin ardından, her iki miR-15/16 lokusunun silindiği çift knocked out bir fare oluşturmuşlardır. Bu farelerin agresif bir AML (%77) ve daha seyrek olarak B hücreli lenfomalar (%23) geliştirdiğini gözlemlemişlerdir. Bu, miR-15a, miR-15b ve miR-16'nın birleşik kaybının ve aşırı ifadesinin akut miyeloid lösemiye yol açtığını gösteren bir sonuçtur [104].

Farklı çalışmalarda, AML ile akut lenfoblastik lösemi arasında ayırmayı yapan, miR-23a, miR-27a/b, miR-128a, miR-128b, miR-221, miR-222, miR-223 ve let-7b gibi bazı spesifik miRNA profilleri rapor edilmiştir. inv(16) ile AML'de, farklı araştırmacılar tarafından yüksek düzeyde miR-99a, miR-100 ve miR-224 ifadesi ve miR-126/126 gözlemlenmiştir. Normal karyotipli AML üzerinde gerçekleştirilen miRNA ifade analizi ile, miR-181a/b ve miR-124, miR-128-1, miR-194, miR-219-5p, miR-220a'nın up regülasyon olarak prognostik bir miRNA profilini ortaya çıkarmışlardır, ve miR-320, sırasıyla tam remisyona ulaşamama, nüks etme veya ölüm riskinin düşük veya yüksek olmasıyla ilişkilendirilmiştir. TKI'nin kesilmesi için olası biyolojik belirteçleri belirlemek için miRNA tutulumu KML'de de araştırılmıştır; miR-148b ve miR-215, başarılı IM kesilmesine sahip KML vakalarında aşağı regüle edilmiş bir ifade göstermiştir. Bu, miRNA'ların güvenli TKI kesilmesini gösteren KML hastalarında immün süreyansa katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür. Artan kanıtlar, miRNA'ların lösemide potansiyel biyobelirteçler olarak bir rolü olduğunu, daha iyi bir alt tip sınıflandırmasına, prognoz ve tedaviye yanıtı tahmin etmeye izin verdiğini göstermektedir [105]. Araştırmacılar farklı şekilde ifade edilen miRNA'ları, düşük ve yüksek riskli MDS hastaları arasında da incelemiştir. miR-181a/c/d, miR-221, miR-376, miR-125b, miR-155, miR-130a'nın yüksek ifadesinin ve miR-486-5p'nin düşük ifadesinin yüksek riskli MDS hastaları ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Sadece bir çalışma miyelodisplastik/miyeloproliferatif neoplazmalı hastalarda miRNA ekspresyonunu incelemiştir. Bu çalışma, PCR ile kronik miyelomonositik lösemi hastalarının BM'sinden seçilen bir miyelopoezis ile ilişkili miRNA grubunu inceledi. Şaşırtıcı bir şekilde, kontrollere ve atipik kronik miyeloid lösemiye göre kronik miyelomonositik lösemide (ancak kronik miyeloid lösemide değil) sadece miR-10a'nın farklı ekspresyonu (aşağı regüle edilmiş) rapor edilmiştir [106].

Ayrıca, bir dizi mikroRNA'nın, transkripsiyon sonrası *TET* ifadesini bastırdığı söylenmektedir. Cheng ve ark., yapmış oldukları bir çalışmada miR-125b, miR-29a, miR-29b, miR-26a, miR-26b, miR-101 ve miR-7 dahil olmak üzere 30'dan fazla miRNA'nın *TET* seviyelerini azalttığını göstermişlerdir. Song ve ark., miyeloid malignitelerde yüksek oranda ifade edilen onkogenik mikroRNA'nın miR-22 olduğunu vurgulamaktadır. Çalışmalarında, *TET2* eksikliğini taklit ederek, farelerde miR-22'nin ektopik ifadesinin, HKH genişlemesine yol açtığını ve sonuçta miyeloid lösemiye ilerleyen MDS benzeri hematopoetik malignitelerle sonuçlandığını görmüşlerdir. Hastalık fenotipi, miR-22'yi eksprese eden LSK hücreleri wild-type alıcı farelere aktarıldığında nakledilebilirdi. MiR-22 ifadesi tarafından indüklenen anormal hematopoetik fenotipler ve transformasyon, *TET2*'nin zorunlu ifadesi ile tersine çevrildiğini, bunun da *TET2*'nin miR-22'nin merkezi bir down stream hedefi olduğunu söylemektedirler [90].

Çalışmamızda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* ifadelerini tüm hastalık gruplarında kıyaslayıp bir korelasyon olup olmadığını araştırdık. Belirtilen korelasyonların hepsi

istatistiksel olarak anlamlıdır. Hastalık grupları ve miR29a, b ve c arasında anlamlı ilişki bulundu. Fakat, literatürde miR-29 ailesi üyelerinin farklı ifade düzeyleri ortaya çıkmaktadır. Bu farklılık hastalık alt tiplerine bağlı olmaktadır.

DNMT3A ve *TET2* genlerini en yüksek skorla hedefleyen miR-29 ailesinin miyeloid maligniteler için birer biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Fakat, mutasyon ve protein düzeyinde varyant proteinlerin varlığının, özellikle miR-29 ailesinin miyeloid maligniteler üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı araştırmaları gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Hu, D., Shilatifard, A. (2016). Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Genes & development*, 30(18), 2021-2041.
- [2]. Luis, T. C., Wilkinson, A. C., Beerman, I., Jaiswal, S., Shlush, L. I. (2019). Biological implications of clonal hematopoiesis. *Experimental hematology*, 77, 1-5.
- [3]. Rieger, M. A., Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a008250.
- [4]. Holmström, M. O., Hasselbalch, H. C. (2019, January). Cancer immune therapy for myeloid malignancies: present and future. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 41, No. 1, pp. 97-109). Springer Berlin Heidelberg.
- [5]. Hansen, M. C., Haferlach, T., Nyvold, C. G. (2020). A decade with whole exome sequencing in haematology. *British journal of haematology*, 188(3), 367-382.
- [6]. Cruz-Rodriguez, N., Combata, A. L., Zabaleta, J. (2018). Epigenetics in hematological malignancies. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine*, 87-101.
- [7]. Docking, T. R., Karsan, A. (2019). Genomic testing in myeloid malignancy. *International journal of laboratory hematology*, 41, 117-125.
- [8]. Sato, H., Wheat, J. C., Steidl, U., Ito, K. (2016). DNMT3A and TET2 in the pre-leukemic phase of hematopoietic disorders. *Frontiers in oncology*, 6, 187.
- [9]. Ciccone, M., Adrian Calin, G. (2015). MicroRNAs in myeloid hematological malignancies. *Current genomics*, 16(5), 336-348.
- [10]. Antoniani, C., Romano, O., Miccio, A. (2017). Concise review: epigenetic regulation of hematopoiesis: biological insights and therapeutic applications. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2106-2114.
- [11]. Wilkinson, A. C., Igarashi, K. J., Nakauchi, H. (2020). Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. *Nature Reviews Genetics*, 21(9), 541-554.
- [12]. Nilsson, A. R., Pronk, C. J. (2017). Retinoic acid puts hematopoietic stem cells back to sleep. *Cell stem cell*, 21(1), 9-11.
- [13]. Dzierzak, E., Bigas, A. (2018). Blood development: hematopoietic stem cell dependence and independence. *Cell stem cell*, 22(5), 639-651.
- [14]. Cheng, H., Zheng, Z., Cheng, T. (2020). New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. *Protein & cell*, 11(1), 34-44.
- [15]. Ghafouri-Fard, S., Niazi, V., Taheri, M. (2021). Contribution of extracellular vesicles in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Heliyon*, 7(1), e06030.
- [16]. Pinho, S., Frenette, P. S. (2019). Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5), 303-320.

- [17]. Nakamura-Ishizu, A., Ito, K., Suda, T. (2020). Hematopoietic stem cell metabolism during development and aging. *Developmental cell*, 54(2), 239-255.
- [18]. Hao, S., Chen, C., Cheng, T. (2016). Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells. *International journal of hematology*, 103(5), 487-497.
- [19]. Lim, S., Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*, 140(15), 3079-3093.
- [20]. Park, S. J., Bejar, R. (2020). Clonal hematopoiesis in cancer. *Experimental hematology*, 83, 105-112.
- [21]. Méndez-Ferrer, S., Bonnet, D., Steensma, D. P., Hasserjian, R. P., Ghobrial, I. M., Gribben, J. G., Krause, D. S. (2020). Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 20(5), 285-298.
- [22]. Schürch, C. M., Riether, C., Ochsenbein, A. (2013). Dendritic cell-based immunotherapy for myeloid leukemias. *Frontiers in immunology*, 4, 496.
- [23]. Baeza Pérez, G., Calaf, G. M., MONTALVO VILLALBA, M. T., Salgado Prieto, K., Caba Burgos, F. (2019). Frequency of hematologic malignancies in the population of Arica, Chile. *Oncology letters*, 18(5), 5637-5643.
- [24]. Almond, L. M., Charalampakis, M., Ford, S. J., Gourevitch, D., Desai, A. (2017). Myeloid sarcoma: presentation, diagnosis, and treatment. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 17(5), 263-267.
- [25]. Kelly, L. M., Gilliland, D. G. (2002). Genetics of myeloid leukemias. *Annual review of genomics and human genetics*, 3(1), 179-198.
- [26]. Panagal, M., SR, S. K., Sivakurunathan, P., Biruntha, M., Karthigeyan, M., Gopinathe, V., Sekar, D. (2018). MicroRNA21 and the various types of myeloid leukemia. *Cancer gene therapy*, 25(7), 161-166.
- [27]. Medinger, M., Passweg, J. R. (2017). Acute myeloid leukaemia genomics. *British journal of haematology*, 179(4), 530-542.
- [28]. Prada-Arismendy, J., Arroyave, J. C., Röthlisberger, S. (2017). Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood reviews*, 31(1), 63-76.
- [29]. Muñoz, M., Coveñas, R. (2020). The neurokinin-1 receptor antagonist aprepitant, a new drug for the treatment of hematological malignancies: Focus on acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1659.
- [30]. Chaudry, S. F., Chevassut, T. J. (2017). Epigenetic guardian: a review of the DNA methyltransferase DNMT3A in acute myeloid leukaemia and clonal haematopoiesis. *BioMed research international*, 2017.
- [31]. Ladikou, E. E., Sivaloganathan, H., Pepper, A., Chevassut, T. (2020). Acute myeloid leukaemia in its niche: the bone marrow microenvironment in acute myeloid leukaemia. *Current oncology reports*, 22(3), 1-9.
- [32]. Pourrajab, F., Zare-Khormizi, M. R., Hashemi, A. S., Hekmatimoghaddam, S. (2020). Genetic characterization and risk stratification of acute myeloid leukemia. *Cancer management and research*, 12, 2231.

- [33]. Marcucci, G., Haferlach, T., Döhner, H. (2011). Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*, 29(5), 475-486.
- [34]. Handschuh, L. (2019). Not only mutations matter: molecular picture of acute myeloid leukemia emerging from transcriptome studies. *Journal of oncology*, 2019.
- [35]. Gill, H., Leung, A. Y., Kwong, Y. L. (2016). Molecularly targeted therapy in acute myeloid leukemia. *Future Oncology*, 12(6), 827-838.
- [36]. Liu, Y., Cheng, Z., Pang, Y., Cui, L., Qian, T., Quan, L., Fu, L. (2019). Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 1-20.
- [37]. Palejwala, A. H., O'Connor, K. P., Shi, H., Villeneuve, L., Scordino, T., Glenn, C. A. (2019). Chronic myeloid leukemia manifested as myeloid sarcoma: review of literature and case report. *Journal of Clinical Neuroscience*, 64, 269-276.
- [38]. Kotagama, K., Chang, Y., Mangone, M. (2015). miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia. *Drug development research*, 76(6), 278-285.
- [39]. Kang, Z. J., Liu, Y. F., Xu, L. Z., Long, Z. J., Huang, D., Yang, Y., Liu, Q. (2016). The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chinese journal of cancer*, 35(1), 1-15.
- [40]. Izzo, B., Gottardi, E. M., Errichiello, S., Daraio, F., Baratè, C., Galimberti, S. (2019). Monitoring chronic myeloid leukemia: how molecular tools may drive therapeutic approaches. *Frontiers in oncology*, 9, 833.
- [41]. Houshmand, M., Simonetti, G., Circosta, P., Gaidano, V., Cignetti, A., Martinelli, G., Gale, R. P. (2019). Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia*, 33(7), 1543-1556.
- [42]. Litwińska, Z., Machaliński, B. (2017). miRNAs in chronic myeloid leukemia: small molecules, essential function. *Leukemia & lymphoma*, 58(6), 1297-1305.
- [43]. Yurttaş, N. Ö., Eşkazan, A. E. (2020). Novel therapeutic approaches in chronic myeloid leukemia. *Leukemia research*, 91, 106337.
- [44]. Soverini, S., De Benedittis, C., Mancini, M., Martinelli, G. (2015). Mutations in the BCR-ABL1 kinase domain and elsewhere in chronic myeloid leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 15, S120-S128.
- [45]. Di Stefano, C., Mirone, G., Perna, S., Marfe, G. (2016). The roles of microRNAs in the pathogenesis and drug resistance of chronic myelogenous leukemia. *Oncology reports*, 35(2), 614-624.
- [46]. Cumbo, C., Anelli, L., Specchia, G., Albano, F. (2020). Monitoring of minimal residual disease (MRD) in chronic myeloid leukemia: recent Advances. *Cancer Management and Research*, 12, 3175.
- [47]. Westerweel, P. E., Te Boekhorst, P. A., Levin, M. D., Cornelissen, J. J. (2019). New approaches and treatment combinations for the management of chronic myeloid leukemia. *Frontiers in oncology*, 9, 665.
- [48]. Tanaka, T. N., Bejar, R. (2019). MDS overlap disorders and diagnostic boundaries. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(10), 1086-1095.

- [49]. Scalzulli, E., Pepe, S., Colafigli, G., Breccia, M. (2021). Therapeutic strategies in low and high-risk MDS: What does the future have to offer?. *Blood reviews*, 45, 100689.
- [50]. Menssen, A. J., Walter, M. J. (2020). Genetics of progression from MDS to secondary leukemia. *Blood*, 136(1), 50-60.
- [51]. Ogawa, S. (2020). Genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 96(3), 107-121.
- [52]. Ogawa, S. (2019). Genetics of MDS. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(10), 1049-1059.
- [53]. Nagata, Y., Maciejewski, J. P. (2019). The functional mechanisms of mutations in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 33(12), 2779-2794.
- [54]. Sankar, K., Stein, B. L., Rampal, R. K. (2019). Thrombosis in the Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Thrombosis and Hemostasis in Cancer*, 159-178.
- [55]. Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6(4), 372-375.
- [56]. Levine, R. L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B. L., Wernig, G., Huntly, B. J., Gilliland, D. G. (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell*, 7(4), 387-397.
- [57]. Passamonti, F., Maffioli, M. (2016). Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2016(1), 534-542.
- [58]. Kucine, N. (2020). Myeloproliferative Neoplasms in Children, Adolescents, and Young Adults. *Current hematologic malignancy reports*, 15(2), 141-148.
- [59]. Masarova, L., Bose, P., Verstovsek, S. (2019). The rationale for immunotherapy in myeloproliferative neoplasms. *Current hematologic malignancy reports*, 14(4), 310-327.
- [60]. Tremblay, D., Kosiorek, H. E., Dueck, A. C., Hoffman, R. (2021). Evaluation of Therapeutic Strategies to Reduce the Number of Thrombotic Events in Patients With Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. *Frontiers in Oncology*, 10, 3471.
- [61]. Spivak, J. L. (2017). Myeloproliferative neoplasms. *New England Journal of Medicine*, 376(22), 2168-2181.
- [62]. Spivak, J. L. (2018). Polycythemia vera. *Current treatment options in oncology*, 19(2), 1-14.
- [63]. Burgstaller, S., Buxhofer-Ausch, V., Sliwa, T., Beham-Schmid, C., Gastl, G., Geissler, K., Gisslinger, H. (2018). Austrian recommendations for the management of polycythemia vera. *Wiener klinische Wochenschrift*, 130(17), 535-542.
- [64]. Caponetti, G. C., Bagg, A. (2019, January). Genetic studies in the evaluation of myeloproliferative neoplasms. In *Seminars in hematology* (Vol. 56, No. 1, pp. 7-14). WB Saunders.

- [65]. Accurso, V., Santoro, M., Mancuso, S., Napolitano, M., Carlisi, M., Mattana, M., Siragusa, S. (2020). The Essential Thrombocythemia in 2020: What We Know and Where We Still Have to Dig Deep. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 13, 2634853520978210.
- [66]. Meier, B., Burton, J. H. (2014). Myeloproliferative disorders. *Emergency Medicine Clinics*, 32(3), 597-612.
- [67]. Robinson, A. J., Godfrey, A. L. (2021). Low-Risk Essential Thrombocythemia: A Comprehensive Review. *HemaSphere*, 5(2).
- [68]. Moran, B., Silva, R., Perry, A. S., Gallagher, W. M. (2018, August). Epigenetics of malignant melanoma. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 51, pp. 80-88). Academic Press.
- [69]. Kunitomo, H., Nakajima, H. (2017). Epigenetic dysregulation of hematopoietic stem cells and preleukemic state. *International journal of hematology*, 106(1), 34-44.
- [70]. Wong, K. K., Lawrie, C. H., Green, T. M. (2019). Oncogenic roles and inhibitors of DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in acute myeloid leukaemia. *Biomarker insights*, 14, 1177271919846454.
- [71]. Bruno, S., Bochicchio, M. T., Franchini, E., Padella, A., Marconi, G., Ghelli Luserna di Rorà, A., Martinelli, G. (2019). Identification of Two DNMT3A Mutations Compromising Protein Stability and Methylation Capacity in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of oncology*, 2019.
- [72]. Brunetti, L., Gundry, M. C., Goodell, M. A. (2017). DNMT3A in Leukemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(2), a030320.
- [73]. Yang, L., Rau, R., Goodell, M. A. (2015). DNMT3A in haematological malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 15(3), 152-165.
- [74]. An, J., Rao, A., Ko, M. (2017). TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Experimental & molecular medicine*, 49(4), e323-e323.
- [75]. Chiba, S. (2017). Dysregulation of TET2 in hematologic malignancies. *International journal of hematology*, 105(1), 17-22.
- [76]. Nakajima, H., Kunitomo, H. (2014). TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer science*, 105(9), 1093-1099.
- [77]. Feng, Y., Li, X., Cassady, K., Zou, Z., Zhang, X. (2019). TET2 function in hematopoietic malignancies, immune regulation, and DNA repair. *Frontiers in oncology*, 9, 210.
- [78]. Inoue, S., Lemonnier, F., Mak, T. W. (2016). Roles of IDH1/2 and TET2 mutations in myeloid disorders. *International journal of hematology*, 103(6), 627-633.
- [79]. *Methods in MicroRNA Biogenesis, Identification, Function and Decay*
- [80]. Treiber, T., Treiber, N., Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(1), 5-20.
- [81]. Matsuyama, H., Suzuki, H. I. (2020). Systems and synthetic microRNA biology: from biogenesis to disease pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 132.

- [82]. Han, Z., Rosen, S. T., Querfeld, C. (2020). Targeting microRNA in hematologic malignancies. *Current Opinion in Oncology*, 32(5), 535-544.
- [83]. Chen, P. S., Lin, S. C., Tsai, S. J. (2020). Complexity in regulating microRNA biogenesis in cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 395-401.
- [84]. Amodio, N., Rossi, M., Raimondi, L., Pitari, M. R., Botta, C., Tagliaferri, P., Tassone, P. (2015). miR-29s: a family of epi-miRNAs with therapeutic implications in hematologic malignancies. *Oncotarget*, 6(15), 12837.
- [85]. Kollinerova, S., Vassanelli, S., Modriansky, M. (2014). The role of miR-29 family members in malignant hematopoiesis. *Biomedical Papers*, 158(4), 489-501.
- [86]. Bose, P., Vachhani, P., Cortes, J. E. (2017). Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Current treatment options in oncology*, 18(3), 1-30.
- [87]. Short, N. J., Rytting, M. E., Cortes, J. E. (2018). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, 392(10147), 593-606.
- [88]. Osman, A. E., Deininger, M. W. (2021). Chronic myeloid leukemia: modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Reviews*, 49, 100825.
- [89]. Steensma, D. P. (2018). Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*, 8(5), 1-7.
- [90]. Venugopal, S., Mascarenhas, J. (2020). Novel therapeutics in myeloproliferative neoplasms. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 1-13.
- [91]. Visser, O., Trama, A., Maynadié, M., Stiller, C., Marcos-Gragera, R., De Angelis, R., RARECARE Working Group. (2012). Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European journal of cancer*, 48(17), 3257-3266.
- [92]. Roman, E., Smith, A., Appleton, S., Crouch, S., Kelly, R., Kinsey, S., Patmore, R. (2016). Myeloid malignancies in the real-world: Occurrence, progression and survival in the UK's population-based Haematological Malignancy Research Network 2004–15. *Cancer epidemiology*, 42, 186-198.
- [93]. Lin, N., Fu, W., Zhao, C., Li, B., Yan, X., Li, Y. (2017). Biologico-clinical significance of DNMT3A variants expression in acute myeloid leukemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 494(1-2), 270-277.
- [94]. Bruno, S., Bochicchio, M. T., Franchini, E., Padella, A., Marconi, G., Ghelli Luserna di Rorà, A., Martinelli, G. (2019). Identification of Two DNMT3A Mutations Compromising Protein Stability and Methylation Capacity in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of oncology*, 2019.
- [95]. Li, K. K., Luo, L. F., Shen, Y., Xu, J., Chen, Z., Chen, S. J. (2013, January). DNA methyltransferases in hematologic malignancies. In *Seminars in hematology* (Vol. 50, No. 1, pp. 48-60). WB Saunders.
- [96]. Bowman, R. L., Levine, R. L. (2017). TET2 in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(8), a026518.
- [97]. Gurnari, C., Pagliuca, S., Visconte, V. (2021). The Interactome between Metabolism and Gene Mutations in Myeloid Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3135.

- [98]. Han, J. A., An, J., Ko, M. (2015). Functions of TET proteins in hematopoietic transformation. *Molecules and cells*, 38(11), 925.
- [99]. Cazzola, M., Della Porta, M. G., Malcovati, L. (2013). The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(25), 4021-4034.
- [100]. Karimzadeh, M. R., Pourdavoud, P., Ehtesham, N., Qadbeigi, M., Asl, M. M., Alani, B., Pakzad, B. (2021). Regulation of DNA methylation machinery by epi-miRNAs in human cancer: emerging new targets in cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*, 28(3), 157-174.
- [101]. Sadigh, S., Hasserjian, R. P., Hobbs, G. (2020). Distinguishing atypical chronic myeloid leukemia from other Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Current opinion in hematology*, 27(2), 122-127.
- [102]. Vainchenker, W., Kralovics, R. (2017). Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(6), 667-679.
- [103]. Iurlo, A., Cattaneo, D., Gianelli, U. (2019). Blast transformation in myeloproliferative neoplasms: risk factors, biological findings, and targeted therapeutic options. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1839.
- [104]. Balatti, V., Croce, C. M. (2020). MicroRNA dysregulation and multi-targeted therapy for cancer treatment. *Advances in biological regulation*, 75, 100669.
- [105]. Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G., Musto, P., Albano, F. (2021). Dysregulation of miRNA in Leukemia: Exploiting miRNA Expression Profiles as Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7156.
- [106]. Rhyasen, G. W., Starczynowski, D. T. (2012). Deregulation of microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, 26(1), 13-22.

EKLER



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI



Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
23.01.2020	02	2020/31

Karar 31- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığından gelen 20.01.2020 tarih ve 1282691 sayılı yazısı ve ekleri üzerinde görüşüldü.

Doç.Dr. Özlem İzci AY'ın danışmanlığında hazırlanan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Besime DENİZ BABACAN "Miyeloid Malignitilerde, TET2 ve DNMT3A Genleri ile has-miR-29 ifade Düzeylerinin Araştırılması" konulu tez önerisinin "Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin 30/1. maddesi uyarınca kabul edilmesine, durumu danışmanına ve adı geçen öğrenciye bilgi vermek üzere Anabilim Dalı Başkanlığına bildirilmesine oy birliğiyle karar verildi.



Prof.Dr. Bahar TAŞDELEN
(Başkan)



Doç.Dr. Seda TEZCAN ÜLGER
(Üye)



Doç.Dr. Gülay ALTUN UĞRAŞ
(Üye)



Prof.Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT
(Üye)

(Görevli)
Prof.Dr. Öztekin ALGÜL
(Üye)



Doç.Dr. Meral GÜN
(Üye)



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 78017789/050.01.04/ 1315051

20/02/2020

Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Doç. Dr. Özlem İZCİ AY
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Sorumluluğunuzda yapılması tasarlanan "Miyeloid Malignitelerde, TET2 ve DNMT3A Genleri ile hsa-miR-29 İfade Düzeylerinin Araştırılması" adlı araştırmaya ilişkin 19/02/2020 tarihli ve 2020/116 sayılı Kurul Kararı ile Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi arz/rica ederim.



Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Kurul Başkanı

EKLER:

- 1- Kurulun 19/02/2020 tarihli ve 2020/116 sayılı kararı (1 sayfa)
- 2- Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu (3 sayfa)

Adres : MEÜ Çiftlikköy Kampüsü 33343 Yenişehir / MERSİN Ayrıntılı bilgi için irtibat:
Tel : 03243610001-4417 Fax :
e-posta : Elektronik Ağ : www.mersin.edu.tr



MEÜ.ID.FR-001/03

Sayfa 1/1

Yayın Tarihi : 22 / 11 / 2013

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
19/02/2020	04	116

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Miyeloid Malignitelerde, TET2 ve DNMT3A Genleri ile hsa-miR-29 İfade Düzeylerinin Araştırılması" adlı araştırma için hazırlanmış olan ve 13/02/2020 tarihinde sunulan Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Başvuru Formu ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmanın yürürlükte olan yasal düzenlemelere uyularak yürütülmesi ve sonuçlandırılması koşulu ile gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkan

İmza
Prof. Dr. Selma ÜNAL
Başkan Yardımcısı

İmza
Prof. Dr. F. Özlem KANDEMİR
Üye

İmza
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU
KILINÇ
Üye

İmza
Prof. Dr. Murat BOZLU
Üye

İmza
Prof. Dr. M. Sami SERİN
Üye

İmza
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Üye

İmza
Prof. Dr. İsmail ÜN
Üye

İmza
Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi M. Türkan IŞIK
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Nalan TİFTİK
Üye

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa AZİZOĞLU
Üye

Katılmadı
Dr. Öğr. Üyesi Özge KURMUŞ
Üye

İmza
H. Betül LEVENT ERDAL
Üye

İmza
Lale DAĞLI
Üye



Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Başkanı
ASLI GİBİDİR

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Miyeloid Malignitelerde, TET2 ve DNMT3A Genleri ile hsa-miR-29 İfade Düzeylerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Mersin Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Mersin Üniversitesi Çiftlikköy Kampüsü Prof. Dr. Uğur ORAL Kültür Merkezi, 33343, Yenişehir/Mersin
	TELEFON	0 324 361 00 01 / 4417
	FAKS	---
	E-POSTA	meukaek@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Özlem İZCİ AY			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	---			
	DESTEKLEYİCİ	---			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	---			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz- Kan, idrar ve/veya doku gibi biyokimya, mikrobiyoloji ve/veya patoloji koleksiyon materyalleri ile yapılacak araştırma -Gen tedavisi klinik araştırmaları dışında kalan ve tanımlamaya yönelik olarak genetik materyal ile yapılacak araştırma			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Etik Kurul Başkanı

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Miyeloid Malignitelerde, TET2 ve DNMT3A Genleri ile hsa-miR-29 İfade Düzeylerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒			
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	İLAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
	DİĞER: GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN BAŞVURU FORMU	☒			
	ARAŞTIRMACILARIN ÖZ GEÇMİŞİ	☒			
3 ADET LİTERATÜR	☒				
DİĞER	☒	-Çalışmanın Tez Olduğuna İlişkin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Enstitü Yönetim Kurulu Kararı, 23.01.2020 -Proforma Fatura			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2020/116	Tarih: 19.02.2020			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.				

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN	Farmakoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Meslek Bilimleri Bölümü Farmakoloji ABD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Selma ÜNAL	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. F. Özlem KANDEMİR	Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Enfeksiyon Hastalıkları ABD	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Prof. Dr. Olgu HALLIOĞLU KILINÇ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Serbest	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN

Etik Kurul Başkanı

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Miyeloid Malignitelerde, TET2 ve DNMT3A Genleri ile hsa-miR-29 İfade Düzeylerinin Araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	---

Prof. Dr. Murat BOZLU	Üroloji	MEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Üroloji ABD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. M. Sami SERİN	Mikrobiyoloji	MEÜ Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji ABD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☐	E ☐	H ☐
Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN	Biyoistatistik	MEÜ Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim ABD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. İsmail ÜN	Tıbbi Farmakoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji ABD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Nimet KARAGÜLLE	Biyomühendislik	MEÜ Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi M. Türkan İŞİK	Tıp Tarihi ve Etik	MEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Bölümü Hemşirelik Esasları ABD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Nalan TİFTİK	Tıbbi Farmakoloji	MEÜ Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Farmakoloji ABD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa AZIZOĞLU	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	MEÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr. Öğr. Üyesi Özge KURMUŞ	Kardiyoloji	Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Kardiyoloji ABD	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒
Yüksek Şehir Plancısı H. Betül LEVENT ERDAL	Şehir ve Bölge Planlama/Uluslararası Proje Yönetimi	Mersin Mezitli Belediyesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Avukat Lale DAĞLI	Hukuk	Serbest	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐

Prof. Dr. Bahar TUNÇTAN
Etik Kurul Başkanı
İmza:



Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Besime Deniz BABACAN

Doğum Tarihi:

İletişim:

Eğitim Bilgileri:

- **Üniversite** **Mersin Üniversitesi**
Tıp Fakültesi- Sağlık Bilimleri Enstitüsü- Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
- **Üniversite** **Kilis 7 Aralık Üniversitesi – Kilis**
Moleküler Biyoloji ve Genetik – 09/2012 – 06/2016
-Lisans Bitirme Tezi : Prenatal Tanı (doğum öncesi tanı) 2015-2016
- **Lise** **Hasan Adalı Lisesi – Adana**
Fen-Matematik – 09/2008 – 06/2012

İş Deneyimi:

- **Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi:** Klinik Araştırma Birimi /Klinik Araştırma
Koordinatörü (2021-Devam Ediyor)

Sertifikalar:

- Good Clinical Practice (GCP)
- Category A Infectious Substance Affecting Humans Category B, Biologica Substance (IATA)