



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**PAROKSİSMAL NOKTÜRNAL HEMOGLOBİNÜRİ
HASTALIĞINDA POTANSİYEL GENETİK
MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Kutay BULUT

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**PAROKSİSMAL NOKTÜRNAL HEMOGLOBİNÜRİ
HASTALIĞINDA POTANSİYEL GENETİK
MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

Kutay BULUT

Danışman
Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans Programı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Besra ÖZMEN YELKEN

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Biz cahil dediğimiz zaman, mektepte okumamış olanları kastetmiyoruz. Kastettiğimiz ilim, hakikati bilmektir. Yoksa okumuş olanlardan en büyük cahiller çıktığı gibi, hiç okumak bilmeyenlerden de hakikati gören gerçek alimler çıkabilir.

M. Kemal ATATÜRK

Bu tez çalışmasının verileri 14/16 Mart 2024 tarihleri arasında gerçekleştirilen 12. EGE HEMATOLOJİ ONKOLOJİ KONGRESİ'nde sözlü bildiri olarak paylaşılmıştır.

İzmir, 19.08.2024

Kutay BULUT

Özet

Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri Hastalığında Potansiyel Genetik Mekanizmaların Araştırılması

PNH (Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri), ultra nadir olan bir hematolojik kök hücre hastalığıdır. PNH, klasik vakalarda intravasküler ya da ekstrasvasküler hemoliz ile karakterize, hemolitik bozukluğun nadir görülen bir formudur. Kompleman düzenleyicileri olan CD55 ve CD59 eksikliği nedeniyle kompleman hasarına karşı korunmasız kalan eritrositlerde membran hasarlanması sonucu intravasküler hemoliz ortaya çıkmaktadır. PNH, kırmızı kan hücrelerindeki GPI (glikofosfatidil inositol) proteininin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan ve eritrositlerin hemolizi ile sonuçlanan hematolojik bir nadir hastalık türüdür.

PNH tanısı için kullanılan laboratuvar testleri arasında, hemoliz ile ilgili laboratuvar bulgularını içeren Hemogram, Periferik Kan Yayması, Mutlak Retikülosit Sayısı, LDH, Haptoglobin ve Coombs testleri bulunmaktadır. Ayrıca, PNH tanısı için Altın Standart kabul edilen Yüksek Duyarlıklı Akım Sitometri yöntemi (FLAER) ile periferik kan örneğindeki GPI çıpa proteinlerinin eksikliği gösterilerek kandaki PNH klon sayıları analiz edilmekte ve ek olarak yapılan kemik iliği incelemesi ile hastalığın teşhisi konulmaktadır.

Birçok hastalığın ortaya çıkmasında ve hastalığın seyrinde altta yatan bazı moleküler mekanizmalar mevcuttur. Özellikle hematolojik hastalıklarda genetik belirteçler önem arz etmektedir. PNH hastalığı için de saptanabilecek gen veya genlerin ekspresyon seviyelerinin hastalıkla ilişkisi olabileceği düşünülmektedir.

Bu nedenle literatür araştırılığında önceden yapılan çalışmalardan elde edilen veriler sonucunda hastalarda bazı genlerde ortak mutasyonlar saptanmıştır fakat bu genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmemiştir. Bu çalışmada PNH hastalığının daha iyi anlaşılması, altta yatan moleküler mekanizmaların ve bu gruptaki hastaların ortak genlerin ekspresyonunu bulundurup bulundurmamasına göre birbirinden ayrılması amaçlanmaktadır. Amaç doğrultusunda DNMT3A, ASXL1, TET2, EZH2, RUNX1, IDH1, PIGA, PHF6, U2AF1, ATM genlerinin ve kontrol olarak GAPDH geninin ekspresyon seviyelerinin PNH hastalığını klinikte daha rahat ayırt etmek, buna özgü tanıda biyobelirteç olarak ortaya koymak ve hedeflenen genlerin ekspresyon seviyelerinin PNH ile ilişkilisini araştırmak amaçlanmaktadır.

Gen ekspresyon düzeylerinin araştırılıp incelenebilmesi için Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction - qRT-PCR)

analizi hasta gruplarından ve kontrol grubundan elde edilen mRNA örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. PCR analizi gerçekleştirilirken ilgili hedef genler bir housekeeping gen olan GAPDH genine göre kıyaslanmış ve hedef genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir.

DNA metilasyonu ile ilişkili DNMT3A geninde 1,04 katlık bir ekspresyon artışı, ASXL1 geninde 15,30 katlık bir ekspresyon artışı, TET2 geninde 1,57 katlık bir ekspresyon artışı, IDH1 geninde 0,86 katlık bir ekspresyon azalışı, EZH2 geninde 1,87 katlık bir ekspresyon artışı, hastalıkla ilişkili olan PIGA geninde 0,15 katlık bir ekspresyon azalışı, transkripsiyon ile ilişkili RUNX1 geninde 3,58 katlık bir ekspresyon artışı, PHF6 geninde 2,38 katlık bir ekspresyon artışı, DNA tamiri ile ilişkili ATM geninde 3,43 katlık bir ekspresyon artışı, RNA splice ile ilişkili U2AF1 geninde 3,94 katlık bir ekspresyon artışı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre metilasyonla ilişkili genlerin çoğunda ekspresyon artışı gözlemlenmiş ve özellikle ASXL1 genindeki ekspresyon artışı bu genin hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir rol oynayacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler; Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri; kantitatif RT-PCR; gen ekspresyonu

Abstract

Investigation of Potential Genetic Mechanisms in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

PNH (Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria) is an ultra-rare hematologic stem cell disease. PNH is a rare form of acquired hemolytic disorder characterized by episodes of intravascular hemolysis and hemoglobinuria in classic cases. Intravascular hemolysis occurs as a result of membrane damage in erythrocytes that are vulnerable to complement damage due to deficiency of the complement regulators CD55 and CD59. PNH is a rare hematologic disorder that results in hemolysis of erythrocytes due to deficiency of GPI (glycophosphatidyl inositol) protein in red blood cells.

Laboratory tests used for the diagnosis of PNH include Hemogram, Peripheral Blood Smear, Absolute Reticulocyte Count, LDH, Haptoglobin and Coombs tests, which include laboratory findings related to hemolysis. In addition, the High Sensitivity Flow Cytometry method (FLAER), which is considered the Gold Standard for the diagnosis of PNH, analyzes the number of PNH clones in the blood by showing the deficiency of GPI anchor proteins in the peripheral blood sample and diagnoses the disease with an additional bone marrow examination.

There are some molecular mechanisms underlying the emergence and course of many diseases. Genetic markers are especially important in hematologic diseases. It is thought that the expression levels of the gene or genes that can be detected for PNH disease may be associated with the disease.

Therefore, as a result of the data obtained from previous studies in the literature, common mutations in some genes have been detected in patients, but the expression levels of these genes have not been examined. The aim of this study is to better understand the underlying molecular mechanisms of PNH disease and to differentiate patients in this group according to the expression of common genes. In line with this aim, the expression levels of DNMT3A, ASXL1, TET2, EZH2, RUNX1, IDH1, PIGA, PHF6, U2AF1, ATM genes and GAPDH gene as a control are aimed to differentiate PNH disease more easily in the clinic, to reveal it as a biomarker in specific diagnosis and to investigate the association of expression levels of targeted genes with PNH.

In order to investigate and analyze gene expression levels, Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) analysis was performed on mRNA samples obtained from the patient and control groups. During PCR analysis, the relevant target genes were compared to the GAPDH gene, a housekeeping gene, and the expression levels of the target genes were analyzed.

DNA methylation-related DNMT3A gene showed 1.04-fold overexpression, ASXL1 gene showed 15.30-fold overexpression, TET2 gene showed 1.57-fold overexpression, IDH1 gene showed 0.86-fold expression decrease and EZH2 gene showed 1.87-fold overexpression. 0.15-fold expression decrease in the disease-related PIGA gene, 3.58 overexpression in the transcription-related RUNX1 gene, 2.38 overexpression in the PHF6 gene, 3.43 overexpression in the DNA repair-related ATM gene, and 3.94 overexpression in the RNA splice-related U2AF1 gene were detected.

According to these results, overexpression was observed in most of the methylation-related genes and especially the overexpression in ASXL1 gene suggests that this gene will play an important role in the diagnosis and treatment of the disease.

Keywords; Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria; quantitative RT-PCR; gene expression

İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	IX
Grafikler Dizini	XI
Kısaltma Listesi	XII
1. Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları	1
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	1
1.6. Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Hematolojik Maligniteler	3
2.2. Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri (PNH) hastalığı tanımı.....	4
2.3. PNH insidansı ve prevalansı	6
2.4. PNH mortalitesi	7
2.5. PNH Teşhisi	8
2.6. PNH sınıflandırması	8
2.7. PNH tedavisi	9
3. Gereç ve Yöntem.....	13
3.1. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	13
3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	13
3.3. Araştırmanın Değişkenleri	13
3.4. Araştırma Etiği	13
3.5. Veri Toplama Yöntemleri.....	13
3.6. Veri Analizi	14
3.7. Olgu ve Kontrol Grubu	14
3.8. Hedef Genlerin Espresyon Seviyelerinin Analiz Edilmesi	15

3.8.1. Periferik Kandan total RNA izolasyonu	15
3.8.2. İzole Edilen total RNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Değerlerinin Belirlenmesi	17
3.8.3. cDNA (komplementer DNA) Sentezi.....	17
3.8.4. Sentezlenen cDNA Örneklerinin Saflık, Konsantrasyon Değerlerinin ve Dilüsyon Oranının Belirlenmesi	19
3.8.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	19
3.8.5.1. Primerlerin Çözülmesi ve Dilüe Edilmesi	19
3.8.5.2. qRT-PCR.....	19
3.8.6. İstatistiksel Analiz.....	22
4. Bulgular	25
4.1. Olguların Demografik Dağılımı	25
4.2. Hastaların Klinik Laboratuvar Değerleri.....	25
4.3. Hastaların tedavide kullandıkları monoklonal antikor türleri ve dozları	27
4.4. Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri	27
Tartışma.....	33
Sonuç ve Öneriler	39
Kaynaklar	40
Ekler.....	47
Teşekkür	52
Özgeçmiş	53

Tablolar Dizini

Tablo 1. Total RNA izolasyon kiti içeriği.....	15
Tablo 2. cDNA sentez bileşenleri ve hacimleri.....	18
Tablo 3. cDNA termal döngü basamakları.....	19
Tablo 4. qRT-PCR işlemleri için gerekli bileşenler ve hacimleri.....	20
Tablo 5. Biorad CFX96 PCR cihazında ekspresyon analizi protokolü.....	20
Tablo 6. qRT-PCR analizi gerçekleştirilecek genlerin primer tasarımları.....	21
Tablo 7. Olgular ve Kontrol grubunun demografik özellikleri.....	25
Tablo 8. Olgulara ait hemogram değerleri (n=22).....	26
Tablo 9. Olgulara ait diğer klinik değerler.....	26
Tablo 10. Olguların kullandığı monoklonal antikor adları ve sayıları.....	27
Tablo 11. Olguların ekspresyon seviyeleri ve fold change değerleri.....	28

Şekiller Dizini

Şekil 1. PNH hastalarında PIGA mutasyon lokasyonları ve tipleri (Shen, W.vd.. 2014.).....	5
Şekil 2. PNH'nin moleküler temeli. (Parker, C. J. 2016).....	5
Şekil 3. Paroksizmal nokturnal hemoglobinürinin (PNH) heterojen klinik özellikleri. (Fattizzo, B., vd., 2021).....	7
Şekil 4. Paroksizmal nokturnal hemoglobinüride intravasküler ve ekstrasvasküler hemoliz....	10
Şekil 5. Komplementer kaskad inhibitörleri (Hill, A., vd., 2017).....	11
Şekil 6. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında uygulanan PCR protokolü örnek ekran görünümü.....	21
Şekil 7. cDNA sentezinde ve qRT-PCR basamaklarında kullanılan cihazlar.....	23
Şekil 8. cDNA sentezinde ve qRT-PCR basamaklarında kullanılan kitler.....	23
Şekil 9. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve laboratuvar gereçleri.....	24

Grafikler Dizini

Grafik 1. DNA metilasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler	29
Grafik 2. Diğer hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler	30
Grafik 3. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında ekspresyon analizindeki Melt Peak grafiği görüntüsü	31
Grafik 4. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında ekspresyon analizindeki döngü-amplifikasyon grafiği görüntüsü	31
Grafik 5. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında ekspresyon analizindeki erime sıcaklığı grafiği görüntüsü	32



Kısaltma Listesi

PNH	: Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri
qRT-PCR	: Polimerase Chain Reaction
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
AA	: Aplastik Anemi
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
RBC	: Red Blood Cell
FLAER	floresan etiketli inaktif toksin aerolizi
FDA	Food and Drug Agency

1. Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

PNH hastalığı ultra nadir görülen bir hastalıktır. Hastalığın prevalansı 1-9/100.000, insidansı ise 1-10/1.000.000 olarak belirtilmektedir. Bu veriler doğrultusunda hastalıkla ilgili yapılan en ufak bir araştırmadan elde edilecek veriler önem arz etmektedir, özellikle de genetik çalışmalar çok önem arz etmektedir. Literatür araştırıldığında hastalığın tanısında ve tedavisinde aktif olarak kullanılan bir genetik teste rastlanmamıştır. Bu nedenle yapılacak olan çalışmadan elde edilecek verilere göre hastaların kullanmış olduğu farklı ilaç dozlarından, hastalara uygulanabilecek kombine ilaç tedavisine kadar birçok soruyu yanıtlamak gerekmektedir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Çoğu hematolojik malignitelerde ilişkili olan bu genlerin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar kişiye özgü tedavi metoduna ya da kombine ilaç tedavisine katkı sağlayabilir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

PNH nadir hastalığının moleküler patogeneğinde rol oynaması muhtemel bazı genomik düzenlemelerden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerinin tanıda özgün belirteçler olabileceği görüşünden yola çıkılmış ve kliniğe uyarlanabilirliği, hastalıkların teşhisine ve/veya tedavilerine olası katkıların anlaşılabilmesi araştırmanın hipotezini oluşturmaktadır.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Özellikle epigenetik regülatör genlerinden metilasyonla ilişkili olanların ekspresyon seviyesindeki artışlar hastalığın seyrinin ve tedavisinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

PNH hastalığı ultra nadir bir hastalık olduğunda ötürü olgu bulmak diğer hastalıklara göre çok daha zordur. Bununla birlikte kemik iliği transplantasyonu olmuş hastaların örneklerinden çalışılacak veriler heterojenik olacağından ve doğru veriyi yansıtmayacağından dolayı çalışmadan bazı olgular çıkarılmıştır. Bu da oldukça zor bulunan ve çok kıymetli olan verilerin azalmasına neden olmuştur.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı, hematolojik malignitelerin çoğunda mutasyonlar bulunmuş epigenetik regülasyonla ilişkili metile edici genlerin ve diğerk olaylardan (RNA splice, DNA tamir, transkripsiyon faktörü) sorumlu genlerin PNH hastalarındaki ekspresyonda düzeylerinin analiz edilmesidir.



2. Genel Bilgiler

2.1. Hematolojik Maligniteler

Hematolojik maligniteler olarak adlandırılan hastalıklar kan ile ilişkili, kemik iliği ve lenfatik sistem kanserleridir. Bu tür kanserler, kan hücrelerinin anormal, kontrolsüz şekilde büyümesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkar. Kan hücreleri, kemik iliğinde üretildiğinden dolayı bu hücrelerin normal işleyişinin ve yapısının bozulması, vücudun çeşitli bölgelerinde ciddi ve ölümcül sağlık sorunlarına yol açabilir.

Başlıca hematolojik maligniteleri şu şekilde sınıflandırabiliriz:

Lösemiler

- Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)
- Akut Miyeloid Lösemi (AML)
- Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)
- Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Lenfomalar

- Hodgkin Lenfoma (HL)
- Non-Hodgkin Lenfoma (NHL)

Plazma Hücre Bozuklukları

- Multipl Miyelom (MM)
- Plazmasitoma

Miyeloproliferatif Neoplaziler

- Polisitemi Vera (PV)
- Esansiyel Trombositemi (ET)
- Primer Miyelofibroz (PMF)
- Kronik Eozinofilik Lösemi (CEL)

Miyelodisplastik Sendromlar (MDS)

- Refrakter Anemi
- Refrakter Anemi ile Ring Sideroblastları
- Refrakter Anemi ile Aşırı Blastlar

- Kronik Miyelomonositik Lösemi (KMML)

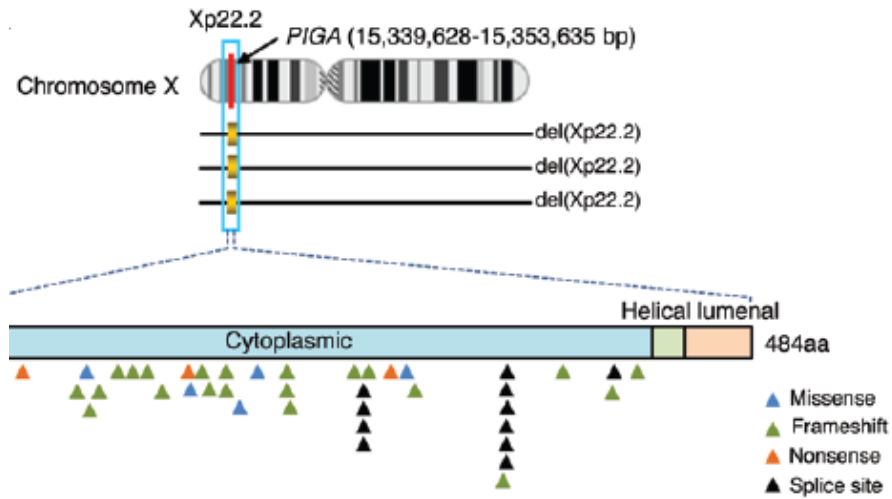
Diğer Nadir Hematolojik Hastalıklar

- Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri (PNH)
- Aplastik Anemi
- Fanconi Anemisi
- Diamond-Blackfan Anemisi (DBA)
- Herediter Sferositoz
- Trombotik Trombositopenik Purpura (TTP)
- Eozinofilik Lösemi
- Kronik Granülamatoz Hastalığı (CGD)
- Waldenström Makroglobulinemi
- Mastositik Lösemi

Her bir başlık, belirli türdeki kan hücrelerinin anormal büyümesi ve çoğalması ile karakterizedir. Bu durumlar genellikle kemik iliği, lenf düğümleri ve dolaşımdaki kan hücrelerini etkiler. Tedavi seçenekleri ve prognoz, spesifik hastalığa ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişir.

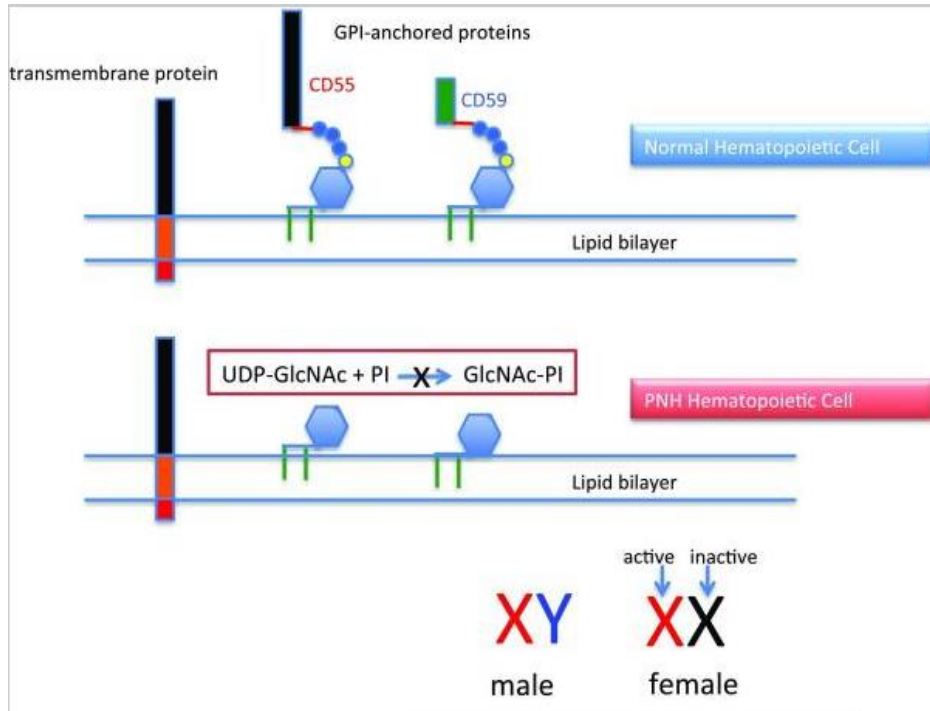
2.2. Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri (PNH) hastalığı tanımı

Paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH), hematopoetik kök hücrelerin nadir görülen, edinsel bir klonal bozukluğudur. Esas olarak X kromozomu üzerindeki fosfatidilinositol glikan çapa biyosentez sınıf A (PIGA) genindeki mutasyonlardan kaynaklanır ve glikozil fosfatidilinositol bağlantılı proteinlerin (GPI-AP'ler) kısmen veya tamamen eksikliğine yol açar. (Li, J. vd., 2020).



Şekil 1. PNH hastalarında PIGA mutasyon lokasyonları ve tipleri (Shen, W.vd.. 2014.)

Bu tür mutasyonlar, birçok farklı hücrel membran proteini için bir çapa molekülü olan glikozil fosfatidil inositol (GPI) üretiminin bozulmasıyla sonuçlanır. Bunlar arasında doğal kompleman inhibitörleri olan ve PNH hücrelerinin membranında kaybolan CD55 (bozunmayı hızlandırıcı faktör, DAF olarak da adlandırılır) ve CD59 (reaktif lizisin membran inhibitörü, MIRL) bulunur. Bunların yokluğu suboptimal kompleman inhibisyonuna ve kırmızı kan hücrelerinin (RBC'ler) kompleman aracılı hemolizine yol açar. (Fattizzo, B. vd., 2021).



Şekil 2. PNH'nin moleküler temeli. (Parker, C. J. 2016).

İki özellik paroksizmal nokturnal hemoglobinüriyi (PNH) diğer tüm hemolitik anemilerden ayırır. Birincisi ve en önemlisi, PNH'nin patobiyolojisinin altında yatan anormallik eritrositle sınırlı değildir. PNH daha ziyade hematopoetik kök hücrenin bir hastalığıdır. İkinci olarak, PNH diğer tüm intrinsik kırmızı hücre anormalliklerinden farklıdır çünkü kusurlu süreç kalıtsal olmaktan ziyade edinseldir. (Parker, C. J. 2016)

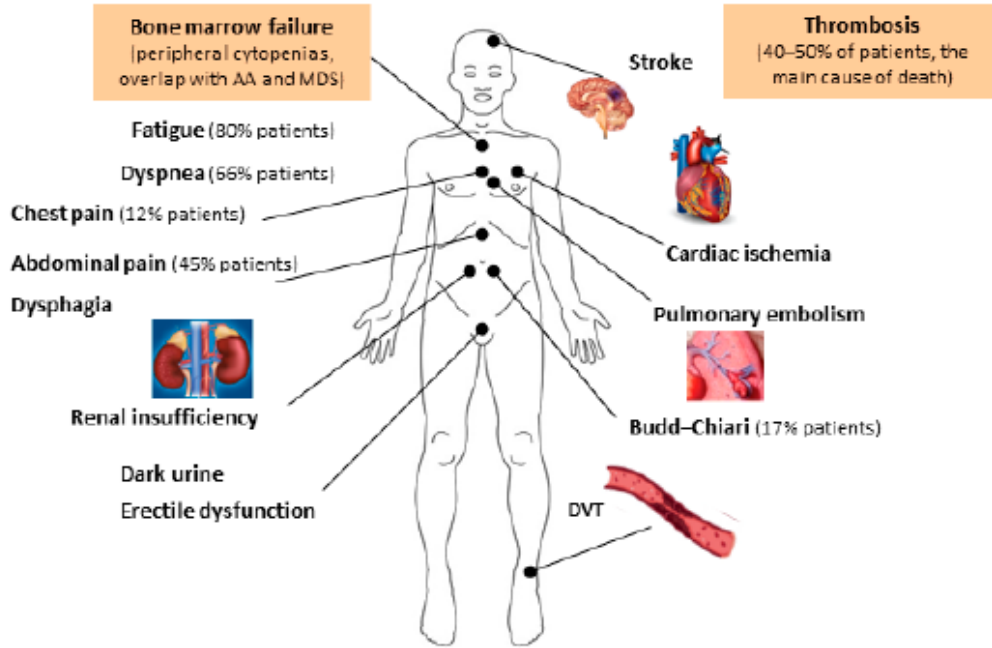
2.3. PNH insidansı ve prevalansı

PNH insidansı milyonda her birey başına 1-1,5 vaka olduğu tahmin edilmektedir, ancak bazı belirli spesifik bölgelerde daha yüksek olabilir. (Socie G. vd., 2016). (Yu, F., Du, Y., & Han, B. 2016.) Hastalık özellikle Asya ülkelerinde (örneğin Japonya, Kore ve Çin) diğer batı ülkelerine (Amerika Birleşik Devletleri, İspanya ve Birleşik Krallık) göre kıyaslandığında daha sık görülmektedir. (Socie G. vd., 2016). (Munoz-Linares C. vd., 2014). Uluslararası PNH Kayıt Merkezi, bu hastalığın doğal seyri hakkında daha kapsamlı ve daha fazla veri toplamak için 2003 yılında kurulmuştur ve bu merkez bazı epidemiyoloji verileri sağlamaktadır. (Socie G. vd., 2016). Klinik PNH tanısı (uygulanabilir herhangi bir tanı yöntemiyle) veya tüm kan hücrelerinin $\geq 0,01$ 'inde PNH'den etkilenmiş kan hücrelerinin (yani bir PNH klonu) saptanabilir bir fraksiyonu olan her yaştaki hastalar dahil edilmeye uygundur. 30 Haziran 2012 itibarıyla 25 ülkedeki 273 merkezden 1.610 hasta kayıtlıdır; bu hastaların %92,5'i Avrupa ve Kuzey Amerika'dandır ve %87,5'i beyaz etnik kökenlidir. Bu dağılımı tam olarak açıklayacak ve çözümleyecek kesin biyolojik veriler mevcut değildir (Hill, A., vd., 2017). Geri kalan hastalar Asya veya Pasifik Adası kökenli (%5), Afrika kökenli (%3,5), yerli/Aborjin kökenli (%0,2) veya diğer ya da bilinmeyen etnik kökenli (%3,9) idi. (Schrezenmeier H., vd., (2014). En belirgin şekilde temsil edilen yaş aralığı 30-59'dur.

PNH çocuklarda çocuklarda nadir olarak görülmektedir, gençlik yıllarında daha çok ortaya çıkma eğilimindedir. (Ware RE, vd., 1991).(van den Heuvel-Eibrink MM, vd., 2005). Uluslararası PNH Kayıt Merkezi'nden elde edilen verilerin sınırlamasının endenlerinden biri de, PNH ile ilgili çalışma bilgilerinin tüm ülkelere elde edilememesidir. Ayrıca, kayıt $> 0,01$ PNH granülositleri olan hastaların dahil edilmesine izin verdiği için Uluslararası PNH Kayıt Merkezi'ne kayıtlı birçok hastanın birincil tanısı aplastik anemidir. (Mukhina GL, vd., 2001). (Sugimori C., vd., 2006).

2.4. PNH mortalitesi

PNH'li hastaların ortanca sağkalımı 1990'larda yaklaşık 10 yıl iken (Hillmen P, vd., 1995).(Socie G., vd., 1996). 2000'lerin başında >20 yıla çıkmıştır. (de Latour RP., vd., 2008) Eculizumab tedavisinin kullanılmaya başlanmasından bu yana PNH hastaları nispeten normal bir yaşam sürebilmektedir (Kelly RJ., vd., 2011) ve eculizumab alan hemolitik PNH hastaları, aplastik anemi gibi daha derin bir kemik iliği yetmezliği bileşeni olan hastalardan daha iyi bir prognoza sahiptir. Bu farklılığın nedeninin, eculizumab moonoklonal antikarunun kemik iliğinde altta yatan üretim eksikliğini tedavi etmemesidir. Uluslararası PNH Kayıt Merkezine kayıttan bu yana ölen 122 hasta için en sık ölüm nedeni (%11,7) PNH ve aplastik anemi tanı kriterlerini karşılayan hastalarda kemik iliği yetmezliğidir. Kayıtlardan elde edilen veriler kullanılarak yapılan tahminler, PNH hastalarının yaklaşık %75'inin eculizumab ile tedavi edildiğini göstermektedir. (Socie G., vd., 2016)



Şekil 3. Paroksizmal nokturnal hemoglobinürinin (PNH) heterojen klinik özellikleri. (Fattizzo, B., vd., 2021)

2.5. PNH Teşhisi

PNH şüphesi varsa (örneğin hasta hemoglobinüri ile başvurursa) istenmesi gereken laboratuvar testleri arasında diferansiyelli tam kan sayımı, retikülosit sayımı, periferik kan yayması ve laktat dehidrogenaz tahlili yer alır. (Hill, A., vd., 2017) PNH' nin klinik tanısında, kan hücrelerinin en az iki veya daha fazla soyunda meydana gelen GPI bağlantılı proteinlerin yokluğunu ve/veya bu proteinlerin ciddi eksikliğini belirlemek için periferik kan örnekleri üzerinde akış sitometrisi ile doğrulanmalıdır. (Hall SE & Rosse WF 1996). (Brodsky RA 2009). GPI bağlantılı proteinlerin tespiti, hücreler monoklonal antikolarla (örneğin anti-CD55 veya anti-CD59) veya GPI çapasının glikan kısmına bağlanabilen özel floresan etiketli proaerolizin (FLAER) (Brodsky RA., vd., (2000) olarak bilinen bir reaktifle etiketi sağlandıktan sonra tespit edilebilir. FLAER testi en iyi çekirdekli hücreler üzerinde kullanılır; bu boya kırmızı kan hücrelerini boyayamaz, çünkü kırmızı kan hücreleri aerolizine bağlanan ve bu bağlanma sonucunda tahlile de müdahale eden bir protein olan yüksek glikoforin eksprese eder. FLAER ve çeşitli monoklonal antikoların bir kombinasyonunu kullanarak GPI bağlantılı protein eksikliği olan kan hücrelerini tespit etmek için konsensüs kılavuzları yayınlanmıştır (Borowitz MJ., vd., (2010). Bazı sağlıklı kontrollerde ve miyelodisplastik sendromlu hastalarda az sayıda PNH granülositleri (<%0,01) veya kırmızı kan hücreleri mevcuttur. Bu gerçekleşen PIGA mutasyonları genellikle hematolojik kök hücrelerde gerçekleşmesinden ziyade koloni oluşturan hücrelerden kaynaklanmaktadır. (Hu R., vd., 2005). (Pu JJ., vd., 2012).

GPI-AP eksikliği kemik iliğinden alınan hematopoetik kök hücrelerde gösterilebilse de, herhangi bir ek tanısal avantajı yoktur ve önerilmemektedir (Madkaikar, M., vd., 2009). Karyotipik anormallikler hastaların %25'ine kadarında mevcut olabilir. (Matsui WH, vd., 2006).

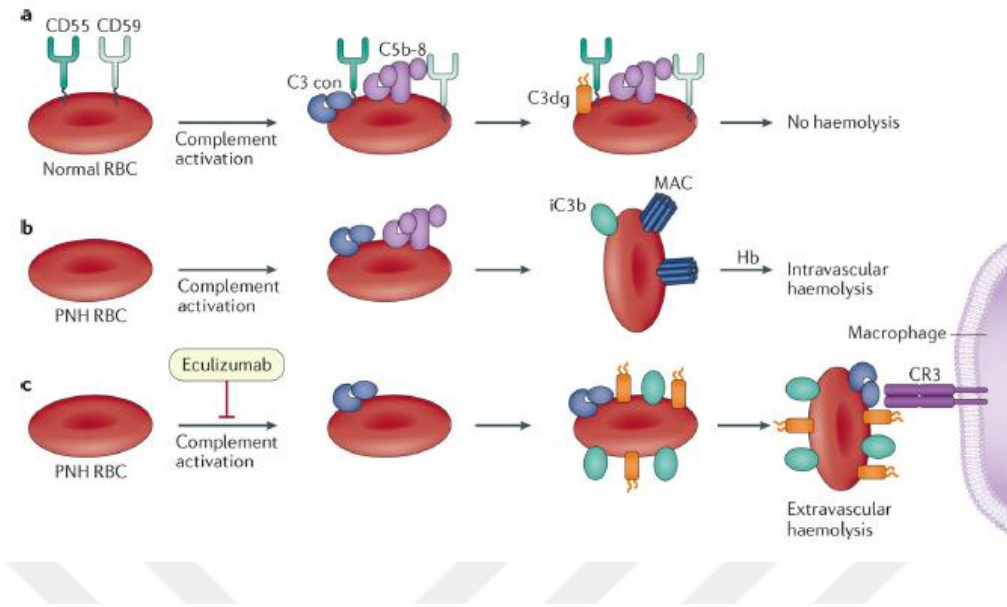
2.6. PNH sınıflandırması

PNH, Coombs-negatif hemolitik anemi, pansitopeni, açıklanamayan karın ağrısı, hemoglobinüri (idrarda yüksek düzeyde hemoglobin bulunması nedeniyle koyu çaydan siyaha ve kiraz kırmızısına kadar değişen renkte idrar çıkarma) ve tromboz gibi çeşitli klinik tablolara sahiptir. PNH de novo olarak ortaya çıkabilir veya edinilmiş aplastik anemiden gelişebilir. Evrensel olarak kabul edilmiş bir sınıflandırma şeması mevcut değildir (Hill, A., vd., 2017).

Uluslararası PNH İlgili Grubu PNH'yi üç kategoride sınıflandırmaktadır: klasik PNH (hastalarda hemoliz veya trombozun klinik belirtileri vardır); diğer primer kemik iliği bozuklukları (aplastik anemi veya miyelodisplastik sendromlar gibi) bağlamında PNH; ve hastalarda düşük oranlarda PNH klonlarının bulunduğu ancak hemoliz veya trombozun klinik veya laboratuvar kanıtlarının bulunmadığı subklinik PNH (Parker C., vd., 2005). Hemolitik PNH hastalarında fizyolojiye yakın nötrofil ve trombosit sayıları, üst fizyolojik sınırın iki katından fazla laktat dehidrogenaz seviyeleri (intravasküler hemolize işaret eder), normoselüler kemik iliği, artmış retikülosit (olgunlaşmamış kırmızı kan hücresi) sayısı ve nispeten büyük bir PNH granülosit popülasyonu (genellikle >%50) olma eğilimindedir. Aplastik anemi-PNH hastaları, şiddetli pansitopeni, hiposelüler kemik iliği, nispeten düşük retikülosit sayısı ve daha düşük bir PNH granülosit yüzdesi ile karakterizedir. Akış sitometrisi ile belirlenen PNH klonu bulunan ve her iki kategorinin kriterlerine uymayan hastalar, orta PNH olarak tanımlanmıştır. Bu sınıflandırma sistemlerinin her ikisinin de sınırlamaları vardır ve zamanla bir hastanın sınıflandırması değişebilir. Örneğin, aplastik anemi-PNH hastaları, PNH klonlarının genişlemesiyle birlikte hematopoezde iyileşme yaşayabilir ve daha sonra hemolitik PNH kriterlerini karşılayabilir. Daha az yaygın olarak ise hemolitik olan PNH hastalarında aplastik anemi-PNH gelişebilme ihtimali vardır.

2.7. PNH tedavisi

Ecilizumab C5'e bağlandıktan sonra C5 konvertaz tarafından bölünmeyi önler ve bunun sonucu olarak terminal kompleman aktivitesini inhibe eder. (Rother RP, vd., 2007). (Hill A., vd., 2005). (Brodsky RA., vd., 2008). Böylece, ecilizumab PNH hastalarında CD59 eksikliğini telafi etmektedir. 2014 yılı itibarıyla, PNH endikasyonu için ecilizumab 14 yıl boyunca dünya çapında >1.000 hastaya güvenle uygulanmıştır. (Socie G., vd., 2016).



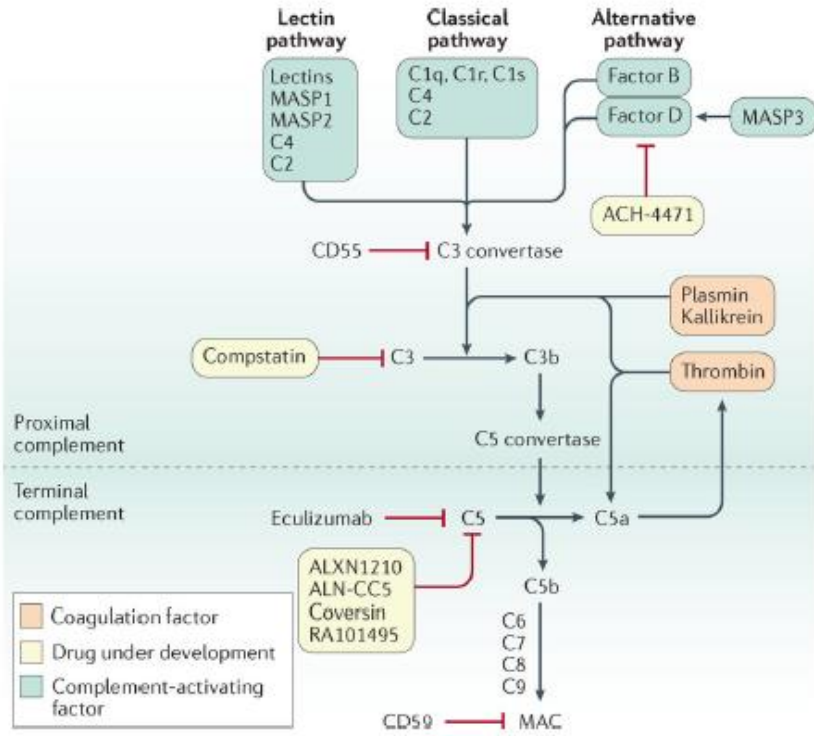
Şekil 4. Paroksizmal nokturnal hemoglobinürde intravasküler ve ekstrasvasküler hemoliz.

- a)** Normal kırmızı kan hücreleri (RBC) aktive olmuş komplemandan korunur. **b)** Bunun aksine, CD55 ve CD59 eksikliği olan paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (PNH) RBC'leri intravasküler hemolize neden olan kompleman aktivasyonuna karşı oldukça hassastır. **c)** Eculizumab tedavisi ile CD59 eksikliği telafi edilir.

Tedavi intravasküler hemolizin çözülmesine, (Hill A., vd., 2005). (Hillmen P., vd., 2004) tromboz oranının azalmasına, (Hillmen P., vd., 2007) böbrek fonksiyonlarının iyileşmesine veya stabilize olmasına, (Hillmen P., vd., 2010) pulmoner basınçlarda iyileşmeye, (Hill A., vd., 2010) (Hill A., vd., 2012) başarılı gebelik sonuçlarına (Kelly RJ., vd., 2015) ve sağkalımda iyileşmeye yol açabilir. (Socie G., vd., 1996). Terminal kompleman blokajının en ciddi riski hayatı tehdit eden neisserial enfeksiyonlardır (yılda ~%0,5 veya 10 yıl sonra %5 insidans). Bu nedenle, eculizumab tedavisi gören tüm hastalar için meningokokal tetravalan polisakkarit aşısı ile *Neisseria meningitidis*'e karşı aşılama sağlanmalıdır. Bununla birlikte, terminal kompleman eksikliği olan hastalarda aşılama enfeksiyon riskini azaltır ancak ortadan kaldırmaz. (Fijen CA., vd., 1998). (Platonov AE, vd., 2003). Aşılama ile daha fazla kompleman aktivasyonu riski vardır. Bu nedenle, tromboz veya akut böbrek yetmezliği gelişme riskini azaltmak klinik öncelik arz ettiğinden, meningokok aşılama başlangıçtaki eculizumab tedavisini takip etmesi gerektiği görüş yer almaktadır ancak bu protokol klinik çalışmalarda doğrulanmamıştır.

- PNH için yeni nesil kompleman inhibitörleri

Eculizumab ile ravulizumab intravasküler hemolizi ve PNH'nin doğal seyrinde trombozu önler ancak ilaçlarla ilgili iyileştirme için hala yer vardır. C5 inhibitörleri kullanan PNH'li hastaların %50'sinden fazlasında PNH'ye bağlı hafif ila orta şiddette semptomlar görülür ve %20'ye varan oranlarda hala ara sıra transfüzyon yapılması gerekir.



Şekil 5. Kompleman kaskad inhibitörleri (Hill, A., vd., 2017).

Devam eden aneminin en yaygın nedeni ekstravasküler hemolizdir. PNH tedavisi için yeni kompleman inhibitörleri geliştirilmektedir ve önümüzdeki bir veya iki yıl içinde birkaç tanesi FDA onaylı hale gelebilir. Pegcetacoplan, haftada iki kez deri altından uygulanan ve hem intravasküler hem de ekstravasküler hemolizi engelleyebilen bir C3 inhibitörüdür. İlaç, faz 3 klinik bir çalışmada eculizumab ile kafa kafaya karşılaştırılmaktadır. Danicopan, kompleman faktör D'yi inhibe ederek alternatif kompleman yolunu bloke eden bir başka umut verici ilaçtır. Danicopan ağızdan uygulanır, hemoglobin seviyelerini yükseltir ve eculizumab kullanan transfüzyona bağımlı PNH hastalarında kan transfüzyonu ihtiyacını ortadan kaldırır. (Brodsky, R. A. 2021)



3. Gereç ve Yöntem

3.1. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

İlgili çalışma Haziran 2023 - Haziran 2024 tarih aralığında Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji laboratuvarı ve PCR laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'ne başvuran hastalardan tanı almış 21 PNH hastası ve kontrol grubu olarak genel dahiliye polikliniğine başvuran ve rutin kontrolleri neticesinde herhangi bir hastalık saptanmayan 10 sağlıklı gönüllü araştırmanın örneklemini oluşturmaktadır. Tanı almış hastalar içerisinde kemik iliği transplantasyonu olan hastalar dışlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Değişkenleri

18 yaş ve üstü kadın/erkek Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri hastalığı olgusu araştırmanın bağımsız değişkenini oluştururken, Çalışma sonucunda elde edilecek DNMT3A, ASXL1, TET2, EZH2, RUNX1, IDH1, PIGA, PHF6, U2AF1, ATM, GAPDH genlerinin ekspresyon seviyeleri ise araştırmanın bağımlı değişkenlerini oluşturmaktadır.

3.4. Araştırma Etiği

Bu çalışmanın etik kurul izni Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu (TAEK) tarafından 23-4T/60 nolu onay kararı ile onaylanmıştır. Etik kurul belgesinde yer alan bilgilendirilmiş olur formuna uygun olarak olgular toplanmıştır.

3.5. Veri Toplama Yöntemleri

Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'ne başvuran ve PNH tanısı almış 18 yaş üstü, kemik iliği transplantasyonu olmamış hastalardan ve kontrol grubundan elde edilen periferik kan örnekleri üzerinden manuel olarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup ardından manuel olarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve cDNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır. İlgili hedef genlerin her hedef gene spesifik primerler varlığında qRT-PCR yöntemi ile referans gen olan GAPDH genine göre kıyaslanarak hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler analiz edilmiştir.

3.6. Veri Analizi

qRT-PCR sonuçları, 2- $\Delta\Delta$ CT yöntemiyle rölatif gen ekspresyon değerleri belirlenmiş olup referans gen olarak GAPDH geni kullanılmıştır. Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki karşılaştırma SPSS paket programında 2 yönlü Student's t-test kullanılarak yapılmıştır ve sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Birden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü ANOVA ve Bonferroni post-test ile veya 2 yönlü ANOVA ile karşılaştırılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.7. Olgu ve Kontrol Grubu

Olgu grubunun seçimi Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD Hematoloji Bilim Dalı'nda bulunan uzman doktorlar ve profesörler ile birlikte gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniği'ne başvuran Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri tanısı almış 21 hastadan onam formu alınarak periferik kan örnekleri alınmıştır.

Bu çalışma için olguların çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıdaki gibidir.

✓ Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- PNH tanısı almış olmaları
- 18 yaş ve üstü olması
- Çalışma ile ilgili bilgilendirilmiş ve yazılı bilgilendirilmiş onay alınmış olması

✓ Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 18 yaş altı olgular
- Kemik iliği transplantasyonu olmuş hastalar
- Çalışmaya katılmak için kendisi onay vermeyen olgular

- ✓ Kontrol grubu için ise 18 yaş üstü hematolojik bir sağlık problemi bulunmayan ve aktif tedavi görmeyen kadın/erkek kişiler olarak belirlenmiştir.

3.8. Hedef Genlerin Espresyon Seviyelerinin Analiz Edilmesi

Çalışmadaki ilgili genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için olgu ve kontrol gruplarından alınan periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş olup izole edilen total RNA örneklerin konsantrasyon seviyeleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş ve belirlenen konsantrasyonlara göre total RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR işlemi için sentezlenen cDNA örnekleri belirlenen konsantrasyonlara göre kullanılmıştır.

3.8.1. Periferik Kandan total RNA izolasyonu

PNH tanısı almış olgulardan alınan 2 EDTA tüp yaklaşık 4 ml periferik kan örneklerinden MACHEREY-NAGEL Nucleospin RNA Blood (Katalog No:740200.50) kiti kullanılarak manuel olarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Total RNA izolasyon kiti içeriği

Bileşen	Hacim/miktar	Bileşen	Hacim/miktar
Lysis Buffer DL	25 ml	RNase-free H ₂ O	13 ml
Wash Buffer RB2	13 ml	NucleoSpin® RNA Blood Columns	50 adet
Wash Buffer RB3 (Concentrate)	12 ml	Collection Tubes (2 mL, with lid) for lysis	50 adet
Membrane Desalting Buffer MDB	25 ml	Collection Tubes (1.5 mL) for elution	50 adet
Reaction Buffer for rDNase	7 ml	Collection Tubes (2 mL)	150 adet
rDNase (lyophilized)	2 vials (size D)	User manual	1 adet
Liquid Proteinase K	600 ul		

Protokol Basamakları:

1. 400 ul tam kan örneği 2 ml'lik kapaklı toplama tüpünün içerisine aktarılır.
2. Tam kan örneğinin üzerine 400 ul Lysis Buffer DL eklenir ve tüpün kapağı kapatılır.
3. Üzerine 10 ul sıvı Proteinaz K eklenir ve tüpün kapağı kapatılır.
4. Lizatın bulunduğu tüp 3-15 dk, oda sıcaklığında (18-25°C) yaklaşık 1000 rpmde thermoshakerda inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrası tüpün içine 400 ul %70 etanol eklenir ve karıştırılır.
6. 610 ul lizat NucleoSpin RNA Blood Column adı verilen filtreli tüpe aktarılır.
7. Filtreli tüp 11.000 g' de 1 dk santrifüj edilir.
8. Santrifüj sonrası tüpün altında bulunan toplama haznesi yenisi ile değiştirilir.
9. Ardından geriye kalan lizatın tamamı yaklaşık 600 ul aynı filtreli tüpe aktarılır.
10. Filtreli tüp 11.000 g' de 1 dk santrifüj edilir.
11. Santrifüj sonrası tüpün altında bulunan toplama haznesi yenisi ile değiştirilir.
12. Filtreli tüpün üst kısmına 350 ul Membran Desalting Buffer eklenir.
13. Filtreli tüp 11.000 g' de 1 dk santrifüj edilir.
14. Santrifüj sonrası tüpün altında bulunan toplama haznesi yenisi ile değiştirilir.
15. Filtreli tüpün üst kısmına 95 ul rDNase eklenir ve oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dk inkübe edilir.
16. İnkübasyon sonrası filtreli tüpün üst kısmına 200 ul Buffer RB2 eklenir.
17. Filtreli tüp 11.000 g' de 1 dk santrifüj edilir.
18. Santrifüj sonrası tüpün altında bulunan toplama haznesi yenisi ile değiştirilir.
19. Filtreli tüpün üst kısmına 600 ul Buffer RB3 eklenir.

20. Filtreli tüp 11.000 g' de 1 dk santrifüj edilir.
21. Santrifüj sonrası tüpün altında bulunan toplama haznesi yenisi ile değiştirilir.
22. Filtreli tüpün üst kısmına 250 ul Buffer RB3 eklenir.
23. Filtreli tüp 11.000 g' de 2 dk santrifüj edilir.
24. Santrifüj sonrası tüpün altında bulunan toplama haznesi çöpe atılır ve filtreli tüp total RNA örneğinin toplanacağı 1,5 ml eppendorfun içine yerleştirilir.
25. Filtreli tüpün üst kısmına 60 ul RNase-free water eklenir.
26. Filtreli tüp 11.000 g' de 1 dk santrifüj edilir.
27. Santrifüj sonrası filtreli tüp çöpe atılır ve total RNA örneği barındıran eppendorf tüp -80°C'de saklanır.

3.8.2. İzole Edilen total RNA Örneklerinin Konsantrasyon ve Saflık Değerlerinin Belirlenmesi

Periferik tam kan örneğinden izole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fiser Scientific) cihazı ile 1-2 ul total RNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Total RNA örneklerinin ölçümü yapılmadan önce izolasyonun son basamağında kullanılan total RNA örneklerinin içinde toplandığı elüsyon sıvısı (RNase-free water) ile cihazda kör (blank) işlemi gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre cihazındaki 260 nm ve 280 nm' deki absorbans değerlerine göre örneklerin total RNA konsantrasyonu ve saflığı tayin edilmiştir. Örnekler bir sonraki basamağa kadar -80°C'de saklanacaktır.

3.8.3. cDNA (komplementer DNA) Sentezi

İzole edilmiş olan total RNA örneklerinden iScript cDNA Synthesis Kit, 100 Rxn (Katalog No:1708891) kiti kullanılarak cDNA sentezi Thermal Cycler cihazında uygun protokole göre gerçekleştirildi.

cDNA Sentez Protokolü

1. Her bir total RNA örneği için steril 0,2 ml' lik eppendorf tüpleri içerisine, 4 ul 5x iScript Reaksiyon karışımı, 1 ul iScript Reverse Transcriptase enzimi, 2 ul total RNA örneği ve 13 ul Nuclease-free water eklenir ve tüplerin içerisindeki total hacim 20 ul' ye tamamlanır.
2. Mikrosantrifüj tüplerine kısa bir spin yapılır ve maddelerin hepsinin tüplerin dibinde toplanması ve tüplerin altında hava kabarcığının kalmaması sağlanır.
3. Spin ardından tüpler Thermal Cycle cihazının ortasından başlanacak şekilde yerleştirilir.
4. Cihazın protokolü ilk önce 25°C'de 5 dk, ardından 46°C'de 20 dk ve 95°C'de 1 dk, son olarak da 4°C'de ayarlanarak cihaz çalıştırılır.

Sentez sonrası elde edilen cDNA örnekleri qRT-PCR çalışması gerçekleştirilene kadar -20°C'de saklanmıştır.

Tablo 2. cDNA sentez bileşenleri ve hacimleri

Bileşenler	Reaksiyon Başına Hacim (ul)
5x iScript Reaksiyon Karışımı	4
iScript Reverse Transkriptaz enzimi	1
Nükleaz-free su	2
RNA örneği	13
Toplam hacim	20

Tablo 3. cDNA termal döngü basamakları

cDNA sentez basamakları	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
Hazırlık	5	25
Reverse Transkripsiyon	20	46
Reverse Transkripsiyon inaktivasyonu	1	95
Opsiyonel soğutma	Maksimum 24 saat	4

3.8.4. Sentezlenen cDNA Örneklerinin Saflık, Konsantrasyon Değerlerinin ve Dilüsyon Oranının Belirlenmesi

Total RNA örnekleri kullanılarak sentezlenen cDNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık değerleri Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fiser Scientific) cihazı ile 1-2 ul cDNA örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre cihazındaki 260 nm ve 280 nm’deki absorbans değerlerine göre cDNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı tayin edilmiştir. qRT-PCR için konsantrasyonu yüksek olan örnekler belirlenen değerlere göre dilüe edilmiştir. Örnekler bir sonraki basamak olan qRT-PCR adımına kadar -20°C’de saklanmıştır.

3.8.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

3.8.5.1. Primerlerin Çözülmesi ve Dilüe Edilmesi

Genlere ait olan primerler 100 uM konsantrasyonda olacak şekilde hesaplanan hacimde Nuclease-free water içerisinde çözüldü. Biorad SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Katalog No: 1725271) kit içeriğinde her forward ve reverse primer için istenen final konsantrasyon maksimum 500 nM olduğundan ve bu çalışmada final reaksiyon hacmi 10 ul olduğundan her primer 1:20 oranında dilüe edilmiş olup final primer konsantrasyonu 5 uM elde edilmiştir.

3.8.5.2. qRT-PCR

Tablo 4’de gösterilen sayısal veriler kullanılarak hedef genler olan DNMT3A, ASXL1, TET2, EZH2, RUNX1, IDH1, PIGA, PHF6, U2AF1, ATM genleri ve referans gen olan GAPDH geni

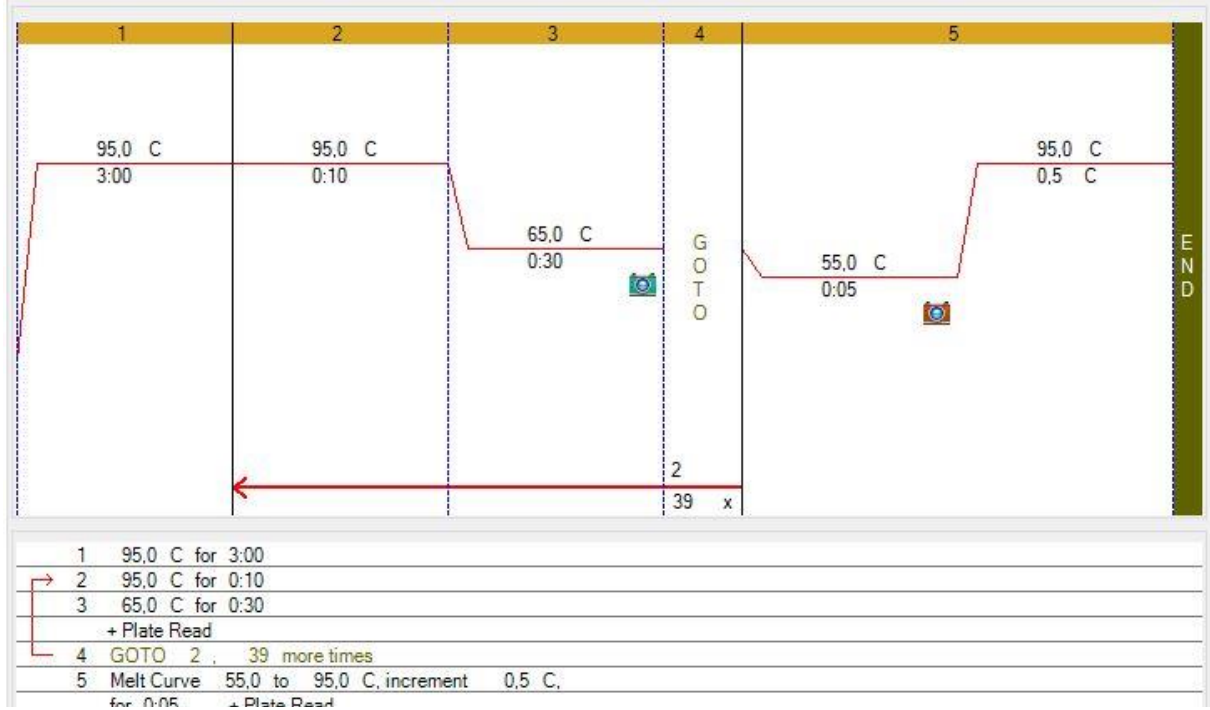
için ayrı ayrı tüplerde PCR mix hazırlanmıştır. Her gen için ayrı hazırlanan bu mix soğuk blok (+4°C) üzerine oturtulmuş 96 PCR plate' in her kuyucuğuna 9 ul olacak şekilde dağıtıldı. Ardından mix dağıtılmış her kuyucuğun içerisine 1 ul cDNA örneği pipetlenerek bırakıldı. 96 PCR plate' in üstü seal cover ile hava geçirmeyecek şekilde bastırılarak kapatıldı ve yaklaşık 1-2 dk 1200 rpm' de bütün sıvıların aşağıda toplanması için santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plate tablo 5' de gösterilen protokole göre Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazına yerleştirilerek PCR basamağı gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. qRT-PCR işlemi için gerekli bileşenler ve hacimleri

Bileşenler	Reaksiyon Başına Hacim (ul)
SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (2x)	5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
DNA örneği	1
Nükleaz-free su	2
Toplam hacim	10

Tablo 5. Biorad CFX96 PCR cihazında ekspresyon analizi protokolü

qRT-PCR protokolü	Süre	Sıcaklık (°C)
Polimeraz aktivasyonu	1 dk	95
Amplifikasyon (40 döngü)	Denatürasyon	15 saniye
	Bağlanma ve Uzama	30 saniye
Opsiyonel soğutma	1 dk	40



Şekil 6. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında uygulanan PCR protokolü örnek ekran görünümü

Tablo 6. qRT-PCR analizi gerçekleştirilecek genlerin primer tasarımları

Gen Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Primer Uzunluğu (bp)
<i>DNMT3A</i>	Forward: AATGGGGACTTGGAGAAGCG	20
	Reverse: TCCTTCTGTTCTTTGCCCGC	20
<i>ASXL1</i>	Forward: CAATTCAAGAGGAGGAGAGGGG	22
	Reverse: GACTAACAGACCACTCCCAAGC	22
<i>PIGA</i>	Forward: TAGAGGAGGAGCTGGGAATGG	21
	Reverse: GCTTTCCACGCCTCCCATATT	21

Tablo 7 devamı. qRT-PCR analizi gerçekleştirilecek genlerin primer tasarımları

<i>EZH2</i>	Forward: ACGGCTTCCCAATAACAGTAGCA	23
	Reverse: ACACCGAGAATTTGCTTCAGAGG	23
<i>TET2</i>	Forward: CCAGGAAGAGCAGTAAGGGAC	21
	Reverse: GGCAAATGGGAGGTGATGGTA	21
<i>RUNX1</i>	Forward: CCACCTACCACAGAGCCATCAA	22
	Reverse: CAGTGGAGTGGTTCAGGGAGG	21
<i>PHF6</i>	Forward: ACCTGTTCTCTCAAGTGCCC	21
	Reverse: ACACCACCAAGCCCTACAAGA	21
<i>ATM</i>	Forward: GACAATCATCACCAAGTTCGCA	22
	Reverse: GGGTTCTCAGCACTATGGGAC	21
<i>IDH1</i>	Forward: ACCAAGTGACGGAACCCAAAA	21
	Reverse: CCAACCCTTAGACAGAGCCAT	21
<i>U2AF1</i>	Forward: TTTAGCCAGACCATTGCCCTC	21
	Reverse: ACTTCCCATACTTCTCCTCCA	22
<i>GAPDH</i>	Forward: ACTTCAACAGCGACACCCAC	20
	Reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	22

3.8.6. İstatistiksel Analiz

Gerçek zamanlı PCR çalışmasından elde edilen verilerin relatif ekspresyon analizi $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplanmış olup veriler Graphpad 8 programı kullanılarak verilerin istatistiksel analizleri yapılmıştır.



a. Biorad CFX96 PCR cihazı



b. Thermal Cycler



c. Mikrosantrifuj

Şekil 7. cDNA sentezinde ve qRT-PCR basamaklarında kullanılan cihazlar

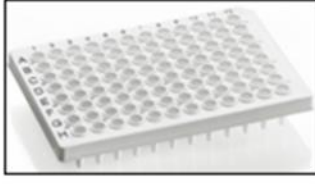


a. SYBR Green Supermix kiti

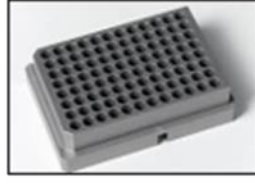


b. cDNA sentez kiti

Şekil 8. cDNA sentezinde ve qRT-PCR basamaklarında kullanılan kitler



a. 96 well plate



b. Metal soğuk blok



c. Eppendorf tüpleri



d. Mikropipetler



e. Mikropipet uçları

Şekil 9. Deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve laboratuvar gereçleri

4. Bulgular

4.1. Olguların Demografik Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen olgular Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'ne Haziran 2023 - Haziran 2024 tarih aralığında başvurmuşlar ve hastalardan tanı almış 10 erkek/11 kadın PNH hastası ve 5 erkek/5 kadın kontrol grubu olarak dahiliye polikliniğine başvuran ve rutin kontrolleri neticesinde herhangi bir hastalık saptanmayan sağlıklı gönüllülerdir. Hasta grubu olguların yaş ortalamaları kontrol olgularına göre daha yüksek kalmaktadır. Bu veriler tablo 7 'de gösterilmektedir.

Tablo 8. Olgu ve Kontrol grubunun demografik özellikleri

		HASTA	KONTROL
YAŞ (Yıl±Std)		45±16	37±16
CİNSİYET	Kadın	11	5
	Erkek	10	5

4.2. Hastaların Klinik Laboratuvar Değerleri

Hasta olgulara ait hemogram değerleri tablo 8'de gösterilmiştir. Verilerin ortalama değerlerine bakıldığında bu hastalarda LDH değeri 241,7 U/L; eritrosit değeri $3,2 \times 10^6/\mu\text{l}$; hemoglobin değeri 10,9 g/dL; hematokrit değeri 32,7 %; total lökosit sayısı $4,2 \times 10^3/\mu\text{l}$; nötrofil sayısı $2,5 \times 10^3/\mu\text{l}$; lenfosit sayısı $1,6 \times 10^3/\mu\text{l}$; monosit sayısı $0,3 \times 10^3/\mu\text{l}$; eozinofil sayısı $0 \times 10^3/\mu\text{l}$; bazofil sayısı $0 \times 10^3/\mu\text{l}$ şeklindedir.

Tablo 9. Olgulara ait hemogram değerleri (n=22)

Kan değerleri	Minimum değer	Maksimum değer	Ortalama±Std
LDH (U/L)	161	363	241,7±53,7
Eritrosit ($10^6/\mu\text{l}$)	2,21	4,65	3,2±0,8
Hemoglobin (g/dL)	7,6	15,8	10,9±2,2
Hematokrit (%)	22,4	45,3	32,7±5,7
Lökosit ($10^3/\mu\text{l}$)	1,69	7,27	4,2±1,6
Nötrofil ($10^3/\mu\text{l}$)	0,05	4,38	2,5±1,1
Lenfosit ($10^3/\mu\text{l}$)	0,56	2,58	1,6±0,5
Monosit ($10^3/\mu\text{l}$)	0,1	0,52	0,3±0,1
Eozinofil ($10^3/\mu\text{l}$)	0	0,1	0,0±0,0
Bazofil ($10^3/\mu\text{l}$)	0	0,03	0,0±0,0

Ayrıca hastalığın sonucu olarak ortaya çıkan trombosit ve retikülosit sayısındaki değişimler de tablo 9'da gösterilmiştir. Tabloya göre verilerin ortalama değerlerine bakıldığında bu hastalarda retikülosit sayısı $0,2 \times 10^6/\mu\text{L}$; retikülosit yüzdesi 6,1%; trombosit sayısı ise $142,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ şeklindedir.

Tablo 10. Olgulara ait diğer klinik değerler

Kan Değeri	Minimum değer	Maksimum değer	Ortalama±Std
Retikülosit sayısı ($10^6/\mu\text{L}$)	0,03	0,40	0,2±0,1
Retikülosit yüzdesi (%)	1,34	17,29	6,1±4,5
Trombosit ($10^3/\mu\text{l}$)	12	308	142,7±73,9

4.3. Hastaların tedavide kullandıkları monoklonal antikor türleri ve dozları

Çalışmamızda yer alan hastalar farklı türde ve dozlarda monoklonal antikor tedavileri almaktadır. Kullanılan monoklonal türleri ve olgu sayıları tablo 10 'da gösterildiği gibidir.

Tablo 11. Olguların kullandığı monoklonal antikor adları ve sayıları

Adı	Olgu sayısı	Alınan düzey (mg)
Eculizumab	7	900
	2	1200
Ravulizumab	6	3300
Crovalimab	5	680
Pozelimab	1	800

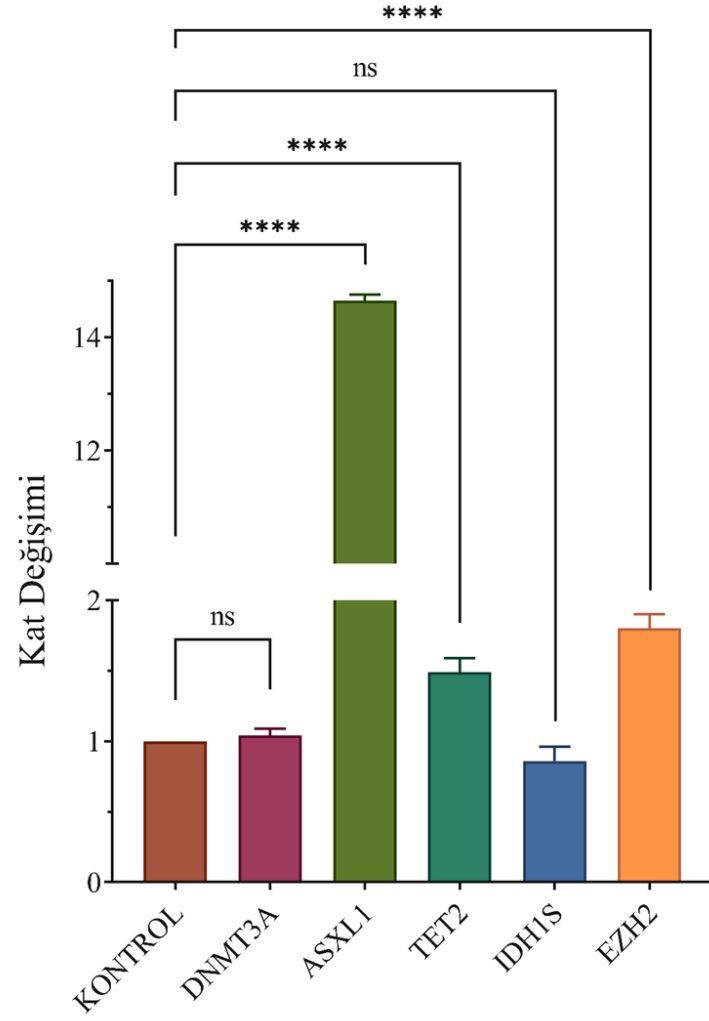
Tablo 10'da da görüldüğü üzere hastalara farklı dozlarda ve farklı ticari isimlerde dört farklı monoklonal antikor tedavisi uygulanmaktadır.

4.4. Hedef genlerin ekspresyon düzeyleri

Hasta ve kontrol grubuna ait olguların hedef genlerdeki ekspresyon seviyeleri incelenip analiz edildiğinde hedef genlerin çoğunda artış gözlemlenmiştir fakat hedef genlerden özellikle DNA metilasyonu ile ilişkili olan ASXL1 geninde yaklaşık 15 kat artış olduğu gözlemlenmiştir. Tablo 11'de, grafik 1'de ve grafik 2'de görüldüğü üzere kontrol ekspresyon seviyesi 1 kabul edildiğinde DNA metilasyonu ile ilişkili DNMT3A geninde 1,04 katlık bir ekspresyon artışı, ASXL1 geninde 15,30 katlık bir ekspresyon artışı, TET2 geninde 1,57 katlık bir ekspresyon artışı, IDH1 geninde 0,86 katlık bir ekspresyon azalışı, EZH2 geninde 1,87 katlık bir ekspresyon artışı, hastalıkla ilişkili olan PIGA geninde 0,15 katlık bir ekspresyon azalışı, transkripsiyon ile ilişkili RUNX1 geninde 3,58 katlık bir ekspresyon artışı, PHF6 geninde 2,38 katlık bir ekspresyon artışı, DNA tamiri ile ilişkili ATM geninde 3,43 katlık bir ekspresyon artışı, RNA splice ile ilişkili U2AF1 geninde 3,94 katlık bir ekspresyon artışı tespit edilmiştir.

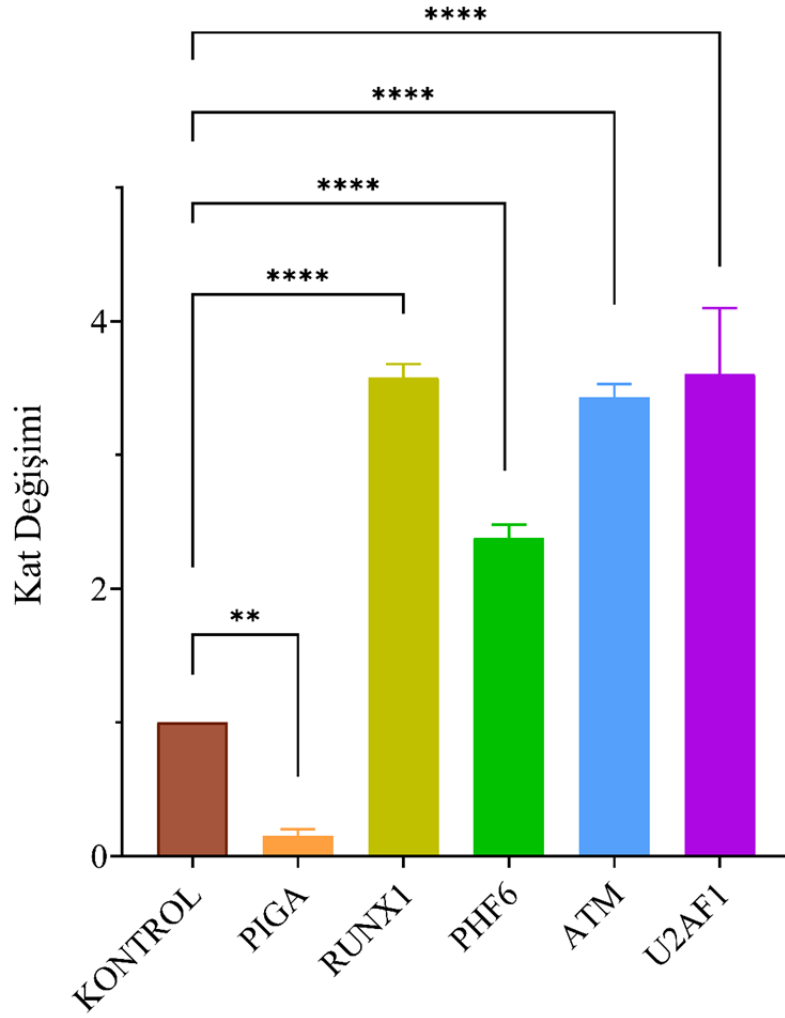
Tablo 12. Olguların ekspresyon seviyeleri ve kat değişim değerleri

Hedef Genler	$\Delta\Delta\text{Ct}$ değerleri (Ort)	$\Delta\Delta\text{Ct}$ değerleri (std)	Kat değişimi	P değeri (<0,0001)
<i>DNMT3A</i>	0,66	1,54	1,04	0,9635
<i>ASXL1</i>	-3,14	1,50	15,30	<0,0001
<i>TET2</i>	-0,29	1,13	1,57	<0,0001
<i>IDH1</i>	0,37	0,71	0,86	0,2129
<i>EZH2</i>	-0,65	0,83	1,87	<0,0001
<i>PIGA</i>	2,73	0,68	0,15	<0,0001
<i>RUNX1</i>	-1,84	1,30	3,58	<0,0001
<i>PHF6</i>	-1,25	1,02	2,38	<0,0001
<i>ATM</i>	-1,78	1,32	3,43	<0,0001
<i>U2AF1</i>	-1,98	1,25	3,94	<0,0001



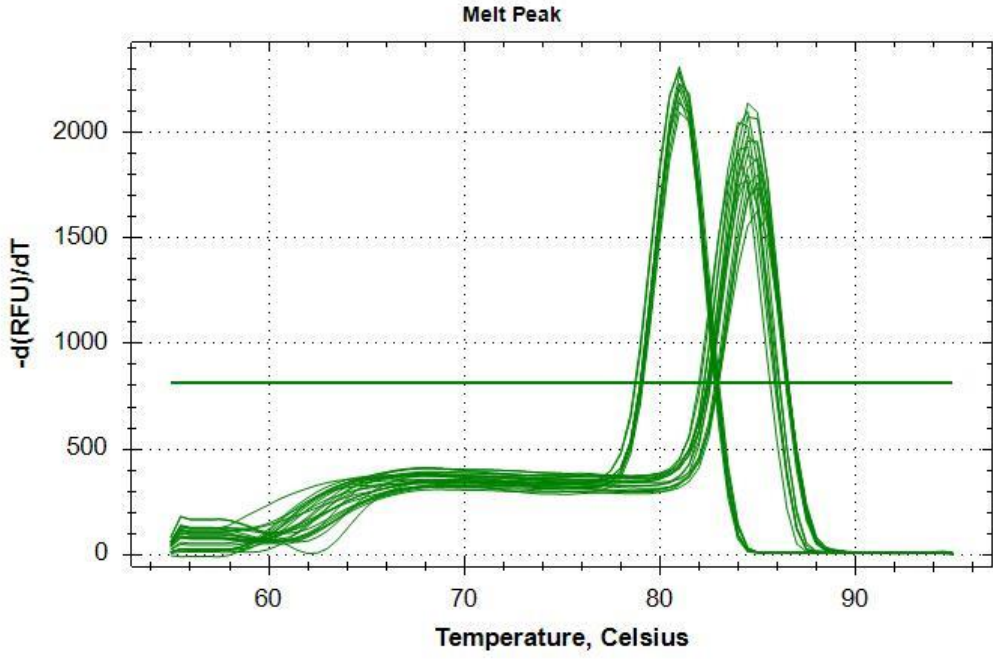
Grafik 1. DNA metilasyonu ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler

****: anlamlı, ns: non-significant

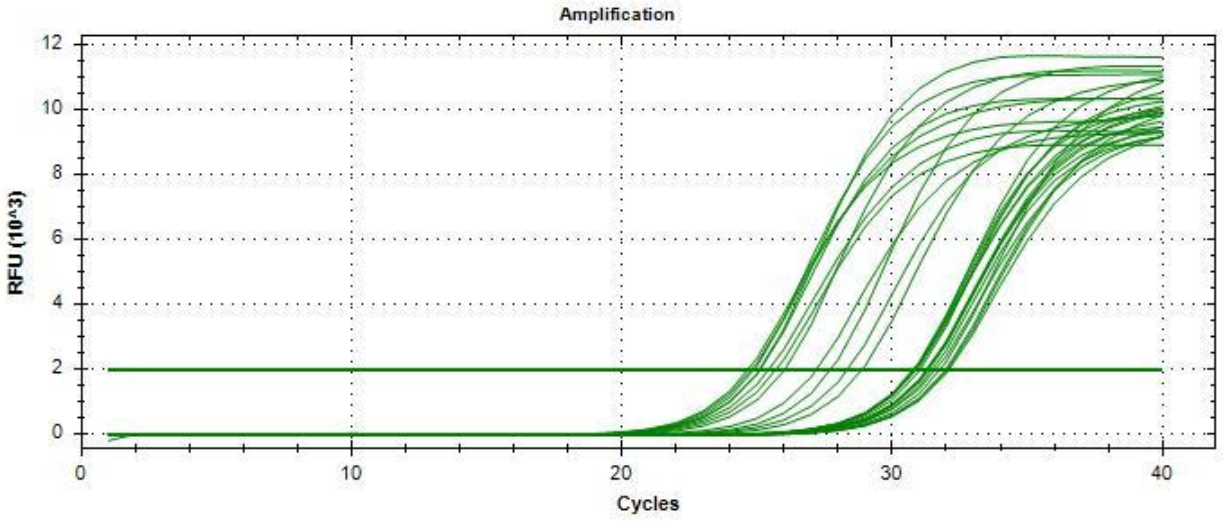


Grafik 2. Diğer hedef genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler
 : anlamlı, **: anlamlı, ns: non-significant

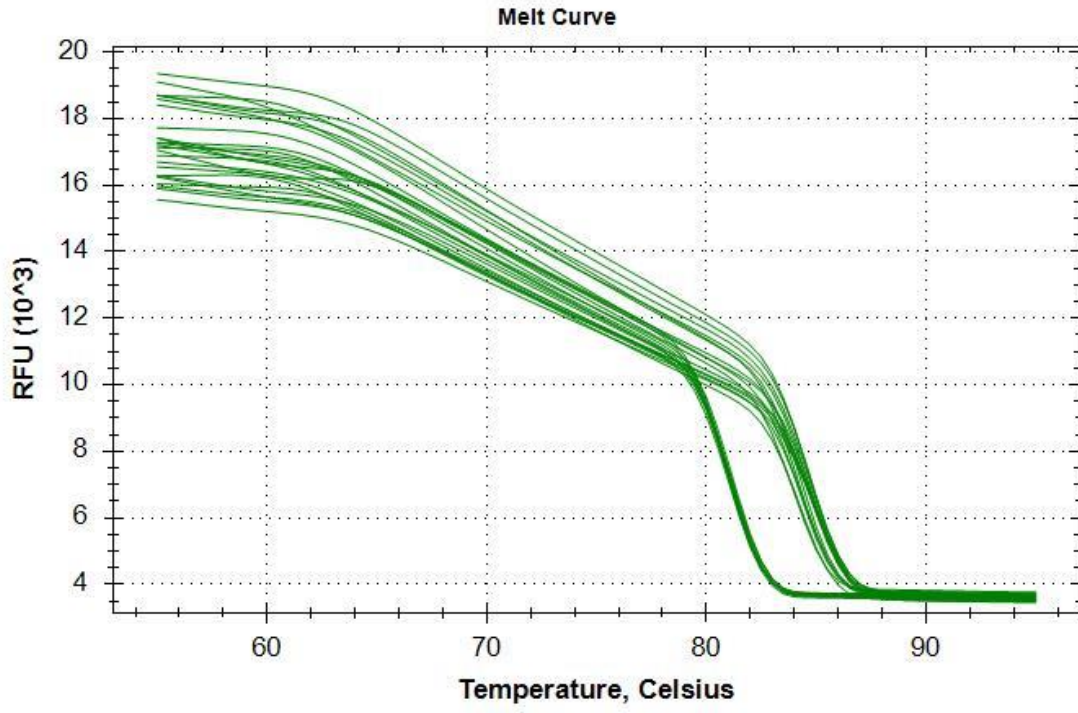
Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilen ekspresyon analizine ait olan ekran görüntülerinden amplifikasyon eğrileri grafiğ 4 'de, melt curve eğrileri grafiğ 5 'de ve melt peak eğrileri ise grafiğ 3 'de gösterilmiştir. Bu şekillerden de anlaşılacağı gibi primerler doğru genlere bağlanmış olup ekspresyon verileri gerçeği yansıtmaktadır.



Grafik 3. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında ekspresyon analizindeki Melt Peak grafiği görüntüsü



Grafik 4. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında ekspresyon analizindeki döngü-amplifikasyon grafiği görüntüsü



Grafik 5. Biorad CFX Connect Real-Time PCR cihazında ekspresyon analizindeki erime sıcaklığı grafiği görüntüsü

Tartışma

PNH hastalığı ultra nadir görülen bir hematolojik kök hücre hastalığıdır. Hastalığın prevalansı 1-9/100.000, insidansı ise 1-10/1.000.000 olarak belirtilmektedir. Bu veriler doğrultusunda hastalıkla ilgili yapılan en ufak bir araştırmadan elde edilecek veriler önem arz etmektedir, özellikle de genetik çalışmalar çok önem arz etmektedir. Çünkü hastalığın teşhisinde veya tedavisinde aktif olarak kullanılan bir genetik test ve/veya tedavi bulunmamaktadır. Bu nedenle hastalığın altında yatan genetik mekanizmaları aydınlatmak önem arz etmektedir. Yapılacak olan çalışmalardan elde edilecek verilere göre hastaların kullanmış olduğu farklı ilaç dozlarından, hastalara uygulanabilecek kombine ilaç tedavilerine hatta belki genetik tedavilere kadar birçok soruyu yanıtlamak gerekmektedir.

Li J. ve ark.'ları yapmış oldukları sekans çalışmasında toplam 85 PNH, MDS ve AA hastaları üzerinden 26 hastada hematolojik malignitelerde ilişkili olan PIGA, DNMT3A, ASXL1, TET2, IDH1S, EZH2, RUNX1, PHF6, BCOR, U2AF1, ATM, FLT3-ITD, BRAF, CALR, CDKN1B, DDX41, DIS3, FAT1, KMT2D, NOTCH2, PDS5B, RAD21, RBBP6, RELN, SETBP1, SETD2 VE SMCIA genlerinin farklı bölgelerinde farklı sayılarda mutasyonlar tespit etmiş ve bunları analiz etmiştir. Bu çalışmada özellikle 24 hastada PIGA gen mutasyonu, 5 hastada DNMT3A gen mutasyonu, 4 hastada ASXL1 gen mutasyonu, 4 hastada U2AF1 gen mutasyonu saptanmıştır. Li J. ve ark.'ları ecilizumab tedavisinin eksik verileri nedeniyle, ecilizumab'a zayıf yanıtla ilişkili mutasyonların bu çalışmada analiz edilmediğini belirtip, PIGA gen mutasyonlarının sayısı ile klinik özellikler arasındaki ilişki hakkında daha az veri bulunduğunu dile getirmişlerdir.. (Li J., vd., 2020)

Wenyi Shen ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmada, 12 hastadan alınan örneklerde eşleştirilmiş PNH+ ve PNH- fraksiyonlarının tüm ekzom dizilemesinin yanı sıra ek 36 PNH hastasının hedefli derin dizilemesini gerçekleştirmişlerdir. Xp22.2 PIGA mikrodelsiyonu olan 3 vakaya ek olarak, WES ve hedefli NGS sekanslama ile analiz edilen vakalarda toplam 31 missense, 8 nonsense, 26 frameshift ve 13 splice bölgesi mutasyonu tespit edilmiştir. WES ile analiz edilen 12 vakanın 9'unun PNH fraksiyonlarında somatik PIGA mutasyonları (3 SNV ve 10 indel) tespit edilmiş, eşleştirilmiş PNH olmayan CD59+ DNA örnekleri ise negatif saptanmıştır. WES vakalarının (n = 12) yanı sıra kohortlarındaki PIGA mutasyonlarının sıklığını daha fazla araştırmak için Sanger sekanslama (n = 36) ve hedefli PIGA (n = 10) derin sekanslama kullanmışlardır. Genel olarak, hastaların %60'ında (60 hastanın 36'sı) PIGA mutasyonları tespit

edilmiştir. Bazı PNH hastaları 1'den fazla PIGA mutasyonu barındırdığını tespit etmişlerdir. Patogonomonik PIGA mutasyonlarına ek olarak, WES ile test edilen vakaların %83'ünde (12'sinin 10'u) 21 başka gende 21 somatik mutasyon bulunmuştur. PNH'de keşfedilen diğer somatik mutasyonlar arasında TET2, MAGEC1, BRPF1, KDM3B ve STAC3 genleri de yer alır, bunların tümü PNH fraksiyonunda bulunur ve fenotipik olarak normal hücrelerde bulunmaz.

Bu çalışmada Li J. ve ark.'larının önceden PNH hastaları ile yapmış oldukları çalışmadan elde edilen veriler analiz edildiğinde mutasyon saptanmış belli genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin analizi aktif olarak farklı türlerde ve dozlarda monoklonal antikor tedavisi alan hastalarla gerçekleştirilmiştir.

DNA Metilasyon İlişkili Genlerin Ekspresyonları

DNMT3A (DNA Metiltransferaz 3 Alfa)

CpG dinükleotidlerinde DNA metilasyonunun kontrolünden sorumlu DNMT enzim ailesinin bir parçasıdır (Shih, Abdel-Wahab, Patel, & Levine, 2012). DNMT3A mutasyonları, klonal hematopoezde tanımlanan en yaygın mutasyon türlerinden biridir. (Genovese vd., 2014). Hematolojik malignitelerin çoğundan sorumlu ve hematolojik hastaların çoğunda mutasyon barından bir genidir. Dolayısıyla bu genin hangi seviyede eksprese edilip edilmediği de önem arz etmektedir.

Yaptığımız çalışmada hematolojik hastalıklarda önemli rol oynayan DNMT3A geninde kontrole kıyasla ortalama 1,04 kat bir artış saptadık fakat bu artış anlamlı değildi. (p=0,9635)

ASXL1 (ASXL Transkripsiyonel Regülatör 1)

Bu gen mutasyonlarının hematolojik hastalıkların prognozu üzerinde önemli etkileri vardır.(Tefferi vd., 2016). Mutasyonlar genellikle ekzon 12'nin 5' ucunda, çoğunlukla çerçeve kayması mutasyonları veya daha az yaygın olarak anlamsız mutasyonlar olarak ortaya çıkar (Grabek vd., 2020). Mutasyonlar genellikle miyeloid malignitelerde heterozigot olarak bulunur (Gelsi-Boyer vd., 2009).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda transkripsiyonel regülatörden sorumlu ASXL1 geninde kontrole kıyasla ortalama 15,30 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

TET2 (TET Metilsitozin Dioksijenaz 2)

5-metilsitosinin 5-hidroksimetilsitosine oksidasyonu yoluyla DNA metilasyonunda önemli rol oynar. Bu, kararlı bir epigenetik işaret görevi görür ve demetilasyonda aktiftir (Shih vd., 2012). TET2 işlev kaybına yol açan anlamsız veya yanlış anlamlı mutasyonlar içerir (Abdel-Wahab vd., 2009).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda TET2 geninde kontrole kıyasla ortalama 1,57 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

IDH1 (izositrat dehidrogenaz)

Sitozolik izositrat dehidrogenaz 1 (IDH1) enzimidaki mutasyonlar, primer insan beyin kanserlerinin önemli bir alt kümesinin ortak bir özelliğidir. Bu mutasyonlar IDH1 aktif bölgesinin tek bir amino asit kalıntısında meydana gelir ve enzimin izositratın α -ketoglutarata dönüşümünü katalize etme yeteneğini kaybetmesine neden olur. (Dang, L., vd., 2009). Daha yakın zamanda MPN hastalarında ASXL1'deki mutasyonlar tanımlanmış ve AML'de tekrarlayan IDH1 mutasyonları tanımlanmıştır. TET2, ASXL1 ve IDH1 mutasyonları miyeloid malignite spektrumuna sahip hastalarda tanımlanmış olsa da, TET2/ASXL1/IDH1 mutasyonlarının edinilme zamanlaması ve MPN'den AML'ye ilerlemede TET2/ASXL1/IDH1 mutasyonlarının rolü bilinmemektedir. (Abdel-Wahab, O., vd., 2010).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda hücre metabolizması ve enerji üretiminden sorumlu IDH1 geninde kontrole kıyasla ortalama 0,86 kat bir azalış saptadık ve bu azalış anlamsızdı. ($p = 0,2129$)

EZH2 (Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit)

Hücre kaderi kararında yer alan genlerin epigenetik susturulmasını başlatmak için PRC2 fonksiyonlarının katalitik bileşenini oluşturan bir histon metiltransferazı kodlar. EZH2 aktivitesi, özellikle nükleozomal histon H3K27'de bir trimetilasyon işareti ile zenginleştirilmiştir (Ernst vd., 2010). Miyeloid hastalığıdaki, özellikle MPN'deki EZH2

mutasyonlarının çoğu, yanlış fonksiyon kaybıdır ve erken zincir sonlanmasına veya histon metiltransferaz alanının doğrudan iptaline yol açar (Score vd., 2012).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda kromatin modifikasyonundan ve metilasyonundan sorumlu TET2 geninde kontrole kıyasla ortalama 1,87 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

PIGA (Fosfotidilinositol Glikan Çapa Biyosentezi Sınıf A)

GPI çapa biyosentezinin ilk adımında yer alan yedi proteinden biridir (Almeida, Layton, & Karadimitris, 2009). Birçok protein GPI tarafından hücrelere bağlanır ve GPI çapalarının yokluğunda bu proteinler bozulur. Eritrositlerde CD55 ve CD59 kaybı, somatik PIGA mutasyonları ile hematopoietik hücrelerin klonal genişlemesinden sonra ortaya çıkan bir hastalık olan paroksizmal nokturnal hemoglobinüride (PNH) kompleman aracılı lizise neden olur (Brodsky, 2008). 2016 yılında yapılan çalışmada, Aplastik anemi (AA) ve PNH hastalarının çoğu, hastalıkları boyunca somatik değişikliklerin gelişmesiyle klonal evrim yaşadığı ve AA hastalarının yaklaşık %15-20'si ve PNH hastalarının %2-6'sı 10 yıl içinde MDS/AML geliştirdiği belirtilmiştir. (Ogawa, 2016).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda GPI çapa protein sentezinden sorumlu PIGA geninde kontrole kıyasla ortalama 0,15 kat bir azalış saptadık ve bu azalış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

RUNX1 (RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 1)

RUNX transkripsiyon faktörleri, gelişim ve normal doku homeostazı için kritik öneme sahiptir ve çeşitli tümörlerin patogeneğinde onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak karakterize edilir (Ito, 2004). RUNX ailesi RUNX1, RUNX2 ve RUNX3 oluşmaktadır. RUNX1'deki fonksiyon kaybı mutasyonları ve silinmesi, MDS ve AML dahil olmak üzere miyeloid malignitelerde sıklıkla gözlenir (Harada vd., 2004; Osato vd., 1999). RUNX1 genindeki yüksek mutasyon sıklığının aksine, hematopoietik malignitesi olan hastalarda RUNX3 geninde delesyon ve fonksiyon kaybı mutasyonları minimaldir. RUNX3, hematopoietik kök ve progenitör hücrelerde (HSPC'ler) ifade edilir (Balogh vd., 2020). Murin RUNX3'ün hematopoietik hücreye özgü silinmesi, eritrositlerin farklılaşmasını bozmuş, ancak miyeloid

hücrelerin üretimini korumuş ve bu da farelerde miyeloproliferatif fenotipin gelişmesine neden olmuştur (C. Q. Wang vd., 2013).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda transkripsiyon faktörü olarak görev alan RUNX1 geninde kontrole kıyasla ortalama 3,58 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

PHF6 (PHD finger protein 6)

PHF6 omurgalılar arasında yüksek oranda korunur ve çok çeşitli insan dokularında her yerde ekspresyon gösterir. (Voss, A. K., vd., 2007).Pediatrik numunelerin %16'sında ve yetişkin birincil T-ALL (T-cell akut lenfoblastik lösemi) numunelerinin %38'inde X'e bağlı bitki homeodomain parmak 6 (PHF6) genindeki inaktive edici mutasyonların ve delesyonların tanımlandığını rapor edilmiştir. Özellikle PHF6 mutasyonları neredeyse yalnızca erkek deneklerden alınan T-ALL örneklerinde bulunur. Özellikle, öncü B-soyun ALL numunelerinde PHF6 mutasyonları tanımlanmadı; bu, PHF6 kaybının, T-hücresi soyunun lenfoid tümörleriyle sınırlı olabilir (Van Vlierberghe, P., vd., 2010) .

Hematopoetik kök hücrelerde (HSC'ler) ve miyeloid progenitörlerde Phf6 ekspresyonunu değerlendirmek için, sıralanmış fare miyeloid progenitör ve lenfoid hücre popülasyonlarının kantitatif RT-PCR analizi yapıldığında bu analizler, lenfoid hücrelerin farklı alt kümelerine kıyasla HSC ve miyeloid hücre progenitör popülasyonlarında PHF6 transkriptlerinin her yerde bulunduğunu ancak biraz daha düşük ekspresyon seviyeleri vardır (Van Vlierberghe, P., vd., 2011).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda transkripsiyonel regülasyondan sorumlu PHF6 geninde kontrole kıyasla ortalama 2,38 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

ATM (Serin/triyonin kinaz)

Hem ATM hem de ATR, DNA hasarıyla aktive edilebiliyor ancak bu iki kinazın bu hasarı nasıl algıladığı tam olarak bilinmiyor. Bununla birlikte, ATM indüklenen çift iplikçik kırılmalarına yanıt verirken, ATR ayrıca UV veya durmuş replikasyon çatallarına da tepki verir. (Lowndes, N. F., vd., 2000). ATM ayrıca UVA ile indüklenen sinyalizasyon ve apoptozda rol oynarken, ATR UVC ile indüklenen sinyalizasyon ve apoptozda işlev görür. ATM kinaz, hücre sağkalımının ve hücre döngüsü kontrol noktalarının önemli bir düzenleyicisidir. UVA'nın UVC'den farklı olarak ATM kinaz aktivitesini tetiklediğini ve aktivasyonun hücrelerin UVA

ile ışınlanmasından sonra üretilen reaktif oksijen türleri yoluyla gerçekleşebilir. Ayrıca ATM aktivasyonunun UVA'ya karşı apoptotik yanıtta rol oynadığını ancak UVC'de rol oynamamaktadır. (Zhang, Y., vd., 2002).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda DNA kırık tamirlerinden sorumlu ATM geninde kontrole kıyasla ortalama 3,43 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

U2AF1 (Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1)

U2AF1 geninin somatik mutasyonları son zamanlarda miyelodisplastik sendrom (MDS) ve akut miyeloid lösemide (AML) tanımlanmıştır. Bu çalışmada, miyeloid neoplazmaları olan 452 Çinli hastadan oluşan bir kohortta U2AF1 mutasyonlarının sıklığını ve klinik etkisi analiz edildiğinde U2AF1'deki mutasyonlar AML hastalarının %2,5'inde ve MDS hastalarının %6,3'ünde bulunurken, 81 KML hastasının hiçbirinde bulunmadığı görüldü. Tüm mutasyonlar heterozigot yanlış anlamlı mutasyonlardır. U2AF1 mutasyonu olan AML hastalarının genel sağkalımı (OS) (medyan 3 ay) mutasyon olmayanlara (medyan 7 ay) göre daha kısaydı ($P = 0.035$). U2AF1 mutasyonu olan ve olmayan MDS hastaları arasında OS açısından fark gözlenmemiştir. Verilerimiz U2AF1 mutasyonunun AML ve MDS'de düşük sıklıkta tekrarlayan bir olay olduğunu göstermektedir. Qian, J., vd., 2012).

Yaptığımız çalışmada analizler sonucunda DNA kırık tamirlerinden sorumlu ATM geninde kontrole kıyasla ortalama 3,94 kat bir artış saptadık ve bu artış anlamlıydı. ($p < 0,0001$)

Sonuç ve Öneriler

Yaptığımız bu bilimsel araştırma çalışması Haziran 2023 - Haziran 2024 tarih aralığında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Polikliniği'ne başvuran hastalardan tanı almış 21 PNH hastası (10 erkek/11 kadın) ve kontrol grubu olarak genel dahiliye polikliniğine başvuran ve rutin kontrolleri neticesinde herhangi bir hastalık saptanmayan 10 sağlıklı gönüllü (5 erkek/5 kadın) grubundan oluşur.

Hastalığı daha da aydılabilecek olan önemli genler üzerinde ekspresyon çalışmaları yapılmış ve farklılıklar saptanmıştır.

DNA metilasyonu ile ilişkili DNMT3A geninde 1,04 katlık bir ekspresyon artışı, ASXL1 geninde 15,30 katlık bir ekspresyon artışı, TET2 geninde 1,57 katlık bir ekspresyon artışı, IDH1 geninde 0,86 katlık bir ekspresyon azalışı, EZH2 geninde 1,87 katlık bir ekspresyon artışı, hastalıkla ilişkili olan PIGA geninde 0,15 katlık bir ekspresyon azalışı, transkripsiyon ile ilişkili RUNX1 geninde 3,58 katlık bir ekspresyon artışı, PHF6 geninde 2,38 katlık bir ekspresyon artışı, DNA tamiri ile ilişkili ATM geninde 3,43 katlık bir ekspresyon artışı, RNA splice ile ilişkili U2AF1 geninde 3,94 katlık bir ekspresyon artışı tespit edilmiştir.

Bu sonuçlara göre özellikle ASXL1 genindeki ekspresyon artışı bu genin hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir rol oynayacağını düşündürmektedir.

Tabii bu genlerde bulunan ekspresyon artışları bu genlerin protein cevaplarının da olup olmadığının araştırılması ile desteklenmelidir. Özellikle epigenetik regülatör genlerin (DNMT3A, ASXL1, TET2, EZH2, IDH1) protein cevaplarının da araştırılmasından sonra, ilgili nadir hastalık ile ilgili hipometile edici ajanlaral bir kombine tedavi uygulanıp uygulanamayacağı tekrar araştırılmalıdır.

Kaynaklar

- Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Patel, J., Harris, K., Yao, J., Hedvat, C., . . . Verstovsek, S. (2010). Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. *Cancer Res*, *70*(2), 447-452. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3783
- Borowitz, M. J., Craig, F. E., Digiuseppe, J. A., Illingworth, A. J., Rosse, W., Sutherland, D. R., . . . Clinical Cytometry, S. (2010). Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, *78*(4), 211-230. doi:10.1002/cyto.b.20525
- Brodsky, R. A. (2009). How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, *113*(26), 6522-6527. doi:10.1182/blood-2009-03-195966
- Brodsky, R. A. (2021). How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, *137*(10), 1304-1309. doi:10.1182/blood.2019003812
- Brodsky, R. A., Mukhina, G. L., Li, S., Nelson, K. L., Chiurazzi, P. L., Buckley, J. T., & Borowitz, M. J. (2000). Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol*, *114*(3), 459-466. doi:10.1093/ajcp/114.3.459
- Brodsky, R. A., Young, N. S., Antonioli, E., Risitano, A. M., Schrezenmeier, H., Schubert, J., . . . Hillmen, P. (2008). Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, *111*(4), 1840-1847. doi:10.1182/blood-2007-06-094136
- de Latour, R. P., Mary, J. Y., Salanoubat, C., Terriou, L., Etienne, G., Mohty, M., . . . French Association of Young, H. (2008). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*, *112*(8), 3099-3106. doi:10.1182/blood-2008-01-133918
- Fattizzo, B., Serpenti, F., Giannotta, J. A., & Barcellini, W. (2021). Difficult Cases of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Diagnosis and Therapeutic Novelties. *J Clin Med*, *10*(5). doi:10.3390/jcm10050948
- Fijen, C. A., Kuijper, E. J., Drogari-Apiranthitou, M., Van Leeuwen, Y., Daha, M. R., & Dankert, J. (1998). Protection against meningococcal serogroup ACYW disease in complement-deficient individuals vaccinated with the tetravalent meningococcal

- capsular polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol*, 114(3), 362-369. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00738.x
- Hall, S. E., & Rosse, W. F. (1996). The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 87(12), 5332-5340.
- Hill, A., DeZern, A. E., Kinoshita, T., & Brodsky, R. A. (2017). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17028. doi:10.1038/nrdp.2017.28
- Hill, A., Hillmen, P., Richards, S. J., Elebute, D., Marsh, J. C., Chan, J., . . . Rother, R. P. (2005). Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 106(7), 2559-2565. doi:10.1182/blood-2005-02-0564
- Hill, A., Rother, R. P., Wang, X., Morris, S. M., Jr., Quinn-Senger, K., Kelly, R., . . . Gladwin, M. T. (2010). Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*, 149(3), 414-425. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08096.x
- Hill, A., Sapsford, R. J., Scally, A., Kelly, R., Richards, S. J., Khurisgara, G., . . . Hillmen, P. (2012). Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *Br J Haematol*, 158(3), 409-414. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09166.x
- Hillmen, P., Elebute, M., Kelly, R., Urbano-Ispizua, A., Hill, A., Rother, R. P., . . . Rosse, W. (2010). Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*, 85(8), 553-559. doi:10.1002/ajh.21757
- Hillmen, P., Hall, C., Marsh, J. C., Elebute, M., Bombara, M. P., Petro, B. E., . . . Rother, R. P. (2004). Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, 350(6), 552-559. doi:10.1056/NEJMoa031688
- Hillmen, P., Lewis, S. M., Bessler, M., Luzzatto, L., & Dacie, J. V. (1995). Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*, 333(19), 1253-1258. doi:10.1056/NEJM199511093331904
- Hillmen, P., Muus, P., Duhrsen, U., Risitano, A. M., Schubert, J., Luzzatto, L., . . . Young, N. S. (2007). Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 110(12), 4123-4128. doi:10.1182/blood-2007-06-095646

- Hu, R., Mukhina, G. L., Piantadosi, S., Barber, J. P., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2005). PIGA mutations in normal hematopoiesis. *Blood*, *105*(10), 3848-3854. doi:10.1182/blood-2004-04-1472
- Kelly, R. J., Hill, A., Arnold, L. M., Brooksbank, G. L., Richards, S. J., Cullen, M., . . . Hillmen, P. (2011). Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*, *117*(25), 6786-6792. doi:10.1182/blood-2011-02-333997
- Kelly, R. J., Hochsmann, B., Szer, J., Kulasekararaj, A., de Guibert, S., Roth, A., . . . Peffault de Latour, R. (2015). Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med*, *373*(11), 1032-1039. doi:10.1056/NEJMoa1502950
- Li, J., Lin, Y., Chen, L., Qin, L., Tan, H., Zou, J., . . . Ru, K. (2020). Identification of acquired PIGA mutations and additional variants by next-generation sequencing in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Lab Hematol*, *42*(4), 473-481. doi:10.1111/ijlh.13228
- Madkaikar, M., Gupta, M., Jijina, F., & Ghosh, K. (2009). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages, & limitations. *Eur J Haematol*, *83*(6), 503-511. doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01338.x
- Matsui, W. H., Brodsky, R. A., Smith, B. D., Borowitz, M. J., & Jones, R. J. (2006). Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, *20*(3), 458-462. doi:10.1038/sj.leu.2404119
- Mukhina, G. L., Buckley, J. T., Barber, J. P., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. (2001). Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol*, *115*(2), 476-482. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.03127.x
- Munoz-Linares, C., Ojeda, E., Fores, R., Pastrana, M., Cabero, M., Morillo, D., . . . Cabrera, J. R. (2014). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single Spanish center's experience over the last 40 yr. *Eur J Haematol*, *93*(4), 309-319. doi:10.1111/ejh.12346
- Parker, C., Omine, M., Richards, S., Nishimura, J., Bessler, M., Ware, R., . . . International, P. N. H. I. G. (2005). Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, *106*(12), 3699-3709. doi:10.1182/blood-2005-04-1717
- Parker, C. J. (2016). Update on the diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, *2016*(1), 208-216. doi:10.1182/asheducation-2016.1.208

- Platonov, A. E., Vershinina, I. V., Kuijper, E. J., Borrow, R., & Kayhty, H. (2003). Long term effects of vaccination of patients deficient in a late complement component with a tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. *Vaccine*, *21*(27-30), 4437-4447. doi:10.1016/s0264-410x(03)00440-7
- Pu, J. J., Hu, R., Mukhina, G. L., Carraway, H. E., McDevitt, M. A., & Brodsky, R. A. (2012). The small population of PIG-A mutant cells in myelodysplastic syndromes do not arise from multipotent hematopoietic stem cells. *Haematologica*, *97*(8), 1225-1233. doi:10.3324/haematol.2011.048215
- Rother, R. P., Rollins, S. A., Mojcik, C. F., Brodsky, R. A., & Bell, L. (2007). Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol*, *25*(11), 1256-1264. doi:10.1038/nbt1344
- Schrezenmeier, H., Muus, P., Socie, G., Szer, J., Urbano-Ispizua, A., Maciejewski, J. P., . . . Hillmen, P. (2014). Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*, *99*(5), 922-929. doi:10.3324/haematol.2013.093161
- Shen, W., Clemente, M. J., Hosono, N., Yoshida, K., Przychodzen, B., Yoshizato, T., . . . Makishima, H. (2014). Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*, *124*(10), 4529-4538. doi:10.1172/JCI74747
- Socie, G., Mary, J. Y., de Gramont, A., Rio, B., Leporrier, M., Rose, C., . . . Gluckman, E. (1996). Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet*, *348*(9027), 573-577. doi:10.1016/s0140-6736(95)12360-1
- Socie, G., Schrezenmeier, H., Muus, P., Lisukov, I., Roth, A., Kulasekararaj, A., . . . Registry, P. N. H. (2016). Changing prognosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria disease subcategories: an analysis of the International PNH Registry. *Intern Med J*, *46*(9), 1044-1053. doi:10.1111/imj.13160
- Sugimori, C., Chuhjo, T., Feng, X., Yamazaki, H., Takami, A., Teramura, M., . . . Nakao, S. (2006). Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*, *107*(4), 1308-1314. doi:10.1182/blood-2005-06-2485
- van den Heuvel-Eibrink, M. M., Bredius, R. G., te Winkel, M. L., Tamminga, R., de Kraker, J., Schouten-van Meeteren, A. Y., . . . Korthof, E. T. (2005). Childhood paroxysmal

- nocturnal haemoglobinuria (PNH), a report of 11 cases in the Netherlands. *Br J Haematol*, 128(4), 571-577. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05337.x
- Ware, R. E., Hall, S. E., & Rosse, W. F. (1991). Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med*, 325(14), 991-996. doi:10.1056/NEJM199110033251403
- Yu, F., Du, Y., & Han, B. (2016). A comparative analysis of clinical characteristics of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria between Asia and Europe/America. *Int J Hematol*, 103(6), 649-654. doi:10.1007/s12185-016-1995-1
- Shen, W., Clemente, M. J., Hosono, N., Yoshida, K., Przychodzen, B., Yoshizato, T., . . . Makishima, H. (2014). Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*, 124(10), 4529-4538. doi:10.1172/JCI74747
- Shih, A. H., Abdel-Wahab, O., Patel, J. P., & Levine, R. L. (2012). The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*, 12(9), 599-612. doi:10.1038/nrc3343
- Genovese, G., Kahler, A. K., Handsaker, R. E., Lindberg, J., Rose, S. A., Bakhoum, S. F., . . . McCarroll, S. A. (2014). Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 371(26), 2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405
- Abdel-Wahab, O., Mullally, A., Hedvat, C., Garcia-Manero, G., Patel, J., Wadleigh, M., . . . Levine, R. L. (2009). Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*, 114(1), 144-147. doi:10.1182/blood-2009-03-210039
- Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., . . . Cross, N. C. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*, 42(8), 722-726. doi:10.1038/ng.621
- Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Jones, A. V., Winkelmann, N., Skinner, A., Ward, D., . . . Cross, N. C. (2012). Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 119(5), 1208-1213. doi:10.1182/blood-2011-07-367243
- Tefferi, A. (2016). Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol*, 91(1), 50-58. doi:10.1002/ajh.24221

- Grabek, J., Straube, J., Bywater, M., & Lane, S. W. (2020). MPN: The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. *Cells*, 9(8). doi:10.3390/cells9081901
- Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adelaide, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., . . . Birnbaum, D. (2009). Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 145(6), 788-800. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x
- Almeida, A., Layton, M., & Karadimitris, A. (2009). Inherited glycosylphosphatidyl inositol deficiency: a treatable CDG. *Biochim Biophys Acta*, 1792(9), 874-880. doi:10.1016/j.bbadis.2008.12.010
- Brodsky, R. A. (2008). Narrative review: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiology of complement-related hemolytic anemia. *Ann Intern Med*, 148(8), 587-595. doi:10.7326/0003-4819-148-8-200804150-00003
- Ogawa, S. (2016). Clonal hematopoiesis in acquired aplastic anemia. *Blood*, 128(3), 337-347. doi:10.1182/blood-2016-01-636381
- Ito, Y. (2004). Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene*, 23(24), 4198-4208. doi:10.1038/sj.onc.1207755
- Harada, H., Harada, Y., Niimi, H., Kyo, T., Kimura, A., & Inaba, T. (2004). High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*, 103(6), 2316-2324. doi:10.1182/blood-2003-09-3074
- Balogh, P., Adelman, E. R., Pluvinage, J. V., Capaldo, B. J., Freeman, K. C., Singh, S., . . . Goldfarb, A. N. (2020). RUNX3 levels in human hematopoietic progenitors are regulated by aging and dictate erythroid-myeloid balance. *Haematologica*, 105(4), 905-913. doi:10.3324/haematol.2018.208918
- Wang, C. Q., Motoda, L., Satake, M., Ito, Y., Taniuchi, I., Tergaonkar, V., & Osato, M. (2013). Runx3 deficiency results in myeloproliferative disorder in aged mice. *Blood*, 122(4), 562-566. doi:10.1182/blood-2012-10-460618
- Van Vlierberghe, P., Palomero, T., Khiabani, H., Van der Meulen, J., Castillo, M., Van Roy, N., . . . Ferrando, A. (2010). PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 42(4), 338-342. doi:10.1038/ng.542., Palomero, T., Khiabani, H., Van der Meulen, J., Castillo, M., Van Roy, N., . . . Ferrando, A. (2010). PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 42(4), 338-342. doi:10.1038/ng.542

- Voss, A. K., Gamble, R., Collin, C., Shoubridge, C., Corbett, M., Gecz, J., & Thomas, T. (2007). Protein and gene expression analysis of Phf6, the gene mutated in the Borjeson-Forsman-Lehmann Syndrome of intellectual disability and obesity. *Gene Expr Patterns*, 7(8), 858-871. doi:10.1016/j.modgep.2007.06.007
- Van Vlierberghe, P., Patel, J., Abdel-Wahab, O., Lobry, C., Hedvat, C. V., Balbin, M., . . . Ferrando, A. (2011). PHF6 mutations in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 25(1), 130-134. doi:10.1038/leu.2010.247
- Lowndes, N. F., & Murguia, J. R. (2000). Sensing and responding to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev*, 10(1), 17-25. doi:10.1016/s0959-437x(99)00050-7
- Zhang, Y., Ma, W. Y., Kaji, A., Bode, A. M., & Dong, Z. (2002). Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *J Biol Chem*, 277(5), 3124-3131. doi:10.1074/jbc.M110245200
- Qian, J., Yao, D. M., Lin, J., Qian, W., Wang, C. Z., Chai, H. Y., . . . Chen, X. X. (2012). U2AF1 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *PLoS One*, 7(9), e45760. doi:10.1371/journal.pone.0045760
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., . . . Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739-744. doi:10.1038/nature08617

Ekler

- Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Paroksizmal Noktürmal Hemoglobinin Hastalığında Potansiyel Genetik Mekanizmaların Araştırılması
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/BOYADI	Doc. Dr. SUNDE YILMAZ GÜSLÜER
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Öğrendi KUTAY BULUT
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ-TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DESTEKLEYİCİ	Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
ARAŞTIRMA TİPİ	Niceliksel Analitik Kohort

KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 23-47/80	Tarih: 08.04.2023
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerektire, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğu toplantıya katılan etik kurul üyelerince Oy birliği ile karar verilmiştir.	

EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

BAŞKANIN UNVANI / ADI / BOYADI:	Prof. Dr. Guzide Aksu
---------------------------------	-----------------------

Unvanı / Adı / Soyadı / EK Üyeligi	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyet	İlgili (*)	Kablim (**)	İmza
Prof. Dr. Guzide Aksu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.D.	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. Banu Sarıak Kumbaraçı Başkan Yardımcısı	Tıbbi Patoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Dr. Öğr. Üyesi Aysun Ekşioğlu Raportör	Ebelik A.D.	Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Anabilim Dalı	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Zeliha Kerry Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Aliye Mandıracıoğlu Üye	Halk Sağlığı A.D.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	Hayır	Hayır	İznil (Görevli)
Prof. Dr. Cengiz Çavuşoğlu Üye	Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E	Hayır	Evet	Online Katıldı

Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Guzide Aksu	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su: 28.09.2011/05
---	----------------------------------	------------------	---------------------------------------



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

Prof. Dr. Ceyda Kabaroğlu Oye	Tıbbi Biyokimya Uzmanı	EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Yasemin Yıldırım Oye	İç Hastalıkları Hemşireliği	Hemşirelik Fakültesi	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Mehmet Çağdaş Eker Oye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	E	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Oya Türkoğlu Oye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji A.D.	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Meltem Sezgi Demirci Oye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Şafak Dağhan Oye	Halk Sağlığı Hemşireliği A.D.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	E	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Gülbın Rudarı Oye	Hareket ve Antrenman Bilimleri	Ege Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi Hareket ve Antrenman Bilimleri AD.	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Prof. Dr. Ahmet Özgür Yeniel Oye	Kadın hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi tıp fakültesi kadın hastalıkları ve doğum uzmanı	E	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. Tahir Atik Oye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları A.D.	E	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. Fatma Sert Oye	Radyasyon Onkolojisi	Ege Üniversitesi	K	Hayır	Evet	Online Katıldı
Doc. Dr. ALI TEKİN Oye	Çocuk Cerrahisi/Çocuk Ürolojisi	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi A.D.	E	Hayır	Evet	Online Katıldı

Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Guziöe Aksu		Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu 22	Rev. Tarihi / No.su. 28.09.2011/05
---	--	----------------------------------	------------------	---------------------------------------

- **Bilgilendirilmiş Olur Formu**

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU	
LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!	
Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürcce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.	
Bu çalışmanın adı ne?	Paroksizmal Noktömal Hemoglobünlü Hastalığında Potansiyel Genetik Mekanizmaların Araştırılması
Bu çalışmanın amacı ne?	Paroksizmal Noktömal Hemoglobünlü (PNH) nadir hastalığının daha iyi anlaşılması için altta yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve bu hasta grubu ile ilgili daha fazla verinin açıklığa kavuşturulması amaçlanmaktadır. Bu moleküler çalışma prognozun belirlenmesi ve hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için önemlidir.
Size nasıl bir uygulama yapılacak?	Sizden bu çalışmada kullanılmak üzere sadece 2-4 ml (2 tüp) kan örneği alınacaktır.
Farklı tedaviler için araştırma gruplarına rastgele atanma olasılığı nedir?	Bu çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülere herhangi bir ilaç uygulaması veya cerrahi bir girişim yapılmayacaktır.
Ne kadar zamanınızı alacak?	Bu çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda size yapılacak olan kan alımı uygulaması ortalama 1-2 dk sürecektir.
Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı kaçtır?	40
Sizden alınacak biyolojik materyallere (kan, idrar ve doku örnekleriniz) ne olacak ve analizler nerede yapılacak? (Analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceği açıklanmalı), Sizden alınan biyolojik materyallerin analizleri Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılacaktır.	
Sizden beklenen nedir? Sizin sorumluluklarınız nelerdir?	Sizden beklediğimiz kan örneklerinizi çalışmamız için kullanmamıza izin vermenizdir. Kan örneklerinin sizden alınması, standart tedaviniz sırasında yapılacaktır. Dolayısıyla bu çalışmaya katılmanız size ilave bir müdahale yapılmasını gerektirmeyecektir. Araştırma ile ilgili olarak herhangi bir sorumluluğunuz yoktur.
Çalışmaya katılmak size ne yarar sağlayacak?	Bu çalışmada yer almak size direkt bir sonuç vermeyecek ancak yapılan moleküler inceleme ile araştırılan PNH hastalığının hangi moleküler temellere dayandığı araştırılacaktır fakat siz sağlıklı grupta yer aldığınız için bu çalışma size yarar veya zarar sağlamayacaktır.
Araştırmaya katılmanın sona erdirilmesini gerektirecek durumlar nelerdir?	Bu çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına sahipsiniz. Eğer örneğinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayarak kan örnekleriniz imha edilecektir.
Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar verebilir mi?	Çalışmaya katılmak size herhangi bir zarar vermeyecektir.
Eğer katılmak istemezseniz ne olur?	Çalışmaya katılmak istemezseniz veya çalışmaya katılmanız halinde, çalışmanın herhangi bir aşamasında çalışmadan ayrılmak isterseniz, ceza almayacaksınız, hiçbir hukuki yaptırımla karşılaşmayacaksınız veya çalışmaya başlamadan önce sahip olduğunuz haklarınızı kaybetmeyeceksiniz. Verileriniz kullanılmayacaktır.
Size uygulanabilecek olan alternatif yöntemler nelerdir?	Bu çalışmaya katılmanız veya katılmamanız durumunda size uygulanacak tedavi değişmeyecek ve size farklı bir yöntem uygulanmayacaktır.

Bu çalışmaya katıldığım için bana herhangi bir ücret ödenecek mi?	
Bu çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.	
Bu çalışmaya katıldığım için ben herhangi bir ücret ödeyecek miyim?	
Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvenesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.	
Bu çalışmada size ait hangi kişisel veriler ve kişisel sağlık verileri kullanılacaktır?	
Bu çalışmada size ait olan, kandan analiz edilecek verilerin tamamı kullanılacaktır.	
Bilgilerin gizliliği:	
Tüm kişisel ve tıbbi bilgileriniz gizli kalacak, sadece bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır. Kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır. Araştırma kapsamında toplanacak kişisel verilerin, 6698 sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu'na uygun toplanıp işlenecek, toplama/işleme amacından başka bir amaç için kullanılmayacak ve paylaşılmayacak, gönüllünün olurlarını geri çekmesi, araştırmacının sonlanması veya kişisel verilerin işlenmesinin son bulmasıyla veriler imha edilecek ve toplanan kişisel verilerin destekleyici, sözleşmeli araştırma kuruluşları ve iştirakleri ile paylaşılmayacak, söz konusu hizmet, Kişisel Sağlık Verileri Hakkında Yönetmelik, İyî Klinik Uygulamalar Kılavuzu ve yürürlükteki mevzuata uygun yürütülecektir.	
Bu çalışmanın sorumlusunun iletişim bilgileri	
1- Adı, soyadı:	SUNDE YILMAZ SÜSLÖER
2- Ulaşılabilir telefon numarası:	
3- Görev yeri:	EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ-TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Çalışmaya Katılma Onayı:	
<p>Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırmaya yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülükle içerisinde kabul ediyorum. Klinik araştırma kapsamında elde edilen tüm kişisel verilerim ile tüm kişisel sağlık verilerimin, bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum. "Bilgilerin gizliliği" başlığı altında belirtilen koşulları kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yasalara bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.</p> <p>Bilgilendirilmiş gönüllü olurunun imzalı ve tarihli bir kopyasının bana verileceğini biliyorum.</p>	
GÖNÜLLÜNÜN	
ADI & SOYADI	
ADRESİ	
TELEFON	
TARİH	
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasisin	
ADI & SOYADI	
ADRESİ	
TELEFON	
TARİH	
Araştırma ekibinde yer alan ve araştırma hakkında bilgilendirmeyi yapan yetkin bir araştırmacının	
ADI & SOYADI	
ADRESİ	
TELEFON	
TARİH	

- **Olgu Rapor Formu**

OLGU RAPOR FORMU

Protokol Adı/Kodu: Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri Hastalığında Potansiyel Genetik Mekanizmaların Araştırılması

Tarih:

Olgu No:

Yaş.....:

Tanı Yaşı.....:

Protokol Adı/Kodu: Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri Hastalığında Potansiyel Genetik Mekanizmaların Araştırılması

Hasta Örneği

1. Kan: Var/Yok

DNA-kan:

RNA-kan:

Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerekli bütün bilgi, deneyimlerini tarafıma aktaran ve destek olan sevgili danışmanım ***Sn. Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER'e***

Tez çalışmamda yer alan nadir hastalık ile tanışmamı, bu hastalığa daha da ilgi duymamı sağlayan, her yardıma ihtiyacım olduğunda yardımları esirgemeyen ve çözüme kavuşturan Ege Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı üyeleri ***Sn. Prof. Dr. Fahri ŞAHİN'e, Sn. Prof. Dr. Güray SAYDAM'a*** ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi üyesi ***Sn. Uzm. Dr. Fatma KEKLİK KARADAĞ'a***

Deneyim ve tecrübelerini benden hiç esirgemeyen, bana akademik yol gösteren ve akıl veren Ege Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı üyesi ***Sn. Prof. Dr. Murat OLUKMAN'a***

Sosyal hayatımda ve tez dönemim boyunca karşılaştığım her türlü sorunda yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, sonuçları birlikte tartışabildiğim sevgili bölüm arkadaşlarıma,

Lisans hayatımda tanıştığım ve her zaman muhabbet edip konuştuğum lisans arkadaşlarıma,

Çocukluğumdan, gençliğime ve ilerde de yaşlılığım tanıklık edecek ve benden kurtulamayacak sevgili çocukluk arkadaşlarım baytarım ***Alp Eren SALI***'ya, doktorum ***Kübra KILIÇ***'a ve çok güzel anne olacak ***Halenur KILIÇ***'a,

Ve son ama en önemlisi beni bu zamana kadar koşulsuz şartsız her zaman destekleyen, hiç eksikliklerini hissetmediğim ve tez dönemim boyunca da bana maddi manevi ekstra yardım eden canım babam ***Nizamettin BULUT***'a ve canım annem ***Vildan BULUT***'a

Şuan kendisi hayatta bizimle birlikte olamasa da benim buralara gelmemde en büyük destekçim ve bu hayatta en değer vermiş olduğum çocukluğumun baş mimarı canım anneannem merhume ***Meral NURANEL'e***

Tez çalışmamı TS-YLT-2023-29732 nolu proje ile destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne sonsuz teşekkürler.

İzmir, 19.07.2024

Kutay BULUT

Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler

- **Adı Soyadı:** Kutay BULUT
- **Doğum Tarihi ve Yeri:**
- **Uyruğu:** TC
- **E-posta Adresi:**

Eğitim

- Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 2021-2024

- Lisans

Pamukkale Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği 2016-2020