

**MİYELOİD HEMATOLOJİK MALİGNENSİLERDE miRNA
OLUŞUM YOLAĞINDAKİ GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GÖR. KENAN ÇEVİK

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

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
KASIM 2018**

**MİYELOİD HEMATOLOJİK MALİGNENSİLERDE MİRNA
OLUŞUM YOLAĞINDAKİ GENLERİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GÖR. KENAN ÇEVİK

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

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

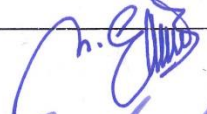
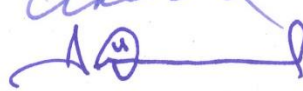
Danışman

Dr. Öğr. Üyesi MUSTAFA ERTAN AY

**MERSİN
KASIM 2018**

ONAY

Kenan ÇEVİK tarafından Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Ertan AY danışmanlığında “Miyeloid Hematolojik Malignansilerde miRNA Oluşum Yolağındaki Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Unvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL	
Üye	Prof. Dr. Hüsnü Ümit LÜLEYAP	
Üye	Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN	
Üye	Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ	
Üye	Dr.Öğr. Üyesi Mustafa Ertan AY	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 15.11.2018 tarih ve 2018/450 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine aykırıdır.

ETİK BEYAN

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

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

ETHICAL DECLARATION

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

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

01.11.2018

İmza

Kenan ÇEVİK

ÖZET

MİYELOİD HEMATOLOJİK MALİGNENSİLERDE MİRNA OLUŞUM YOLAĞINDAKİ GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hematolojik malignansiler, kan, kemik iliği, lenfoid nod ve lenfatik sistemin diğer kısımlarını etkileyen malignant neoplazmlardır. Miyeloid hematolojik malignansiler, yüksek morbidite ve mortaliteye yol açtığından erken tanı ve etkili tedavi oldukça önemlidir. Hematolojik malignansilerin gelişiminde çalışmalar, çoğunlukla miRNA'lar üzerine yoğunlaşmıştır. miRNA'lar hematopoezin potansiyel düzenleyicileridir. Bu çalışmada, miyeloid hematolojik malignansilerde miRNA biyogenezindeki yolağında rol alan *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *XPO5*, *AGO1*, *AGO2* ve *TARBP2* genlerinin ekspresyon düzeyleri araştırıldı.

Çalışma grubuna, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran 34 Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve 20 Akut Miyeloid Lösemi (AML) tanısı almış toplam 54 hasta ve 7 sağlıklı birey dahil edildi. Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi, Seçilen genler, qPCR yöntemiyle analiz edildi. Bu genlerin ekspresyon düzeyleri; Toplam hasta (AML ve MDS)- kontrol, MDS-kontrol, AML-kontrol ve AML-MDS grupları arasında Ki-kare testi, Shapiro-Wilk testi, Student t-testi, Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Her iki grupta da XPO5 ve AGO2 genlerinin ekspresyon düzeyleri Real-time'da saptanamadığı için istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Drosha, *DGCR8*, *Dicer*, *AGO1* ve *TARBP2* genlerinin ekspresyon düzeyleri açısından toplam hasta-kontrol ve MDS-kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). AML-kontrol kıyaslamasında ise *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *AGO1* genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark saptanırken ($p<0,05$), *TARBP2* geninin ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında bir farklılık olmadığı gözlemlendi. MDS-AML kıyaslamasında, *Dicer*, *Drosha*, *DGCR8*, *AGO1* ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0,05$), *TARBP2* ekspresyon düzeyinde ise anlamlı bir farklılık saptandı.

Sonuç olarak, miRNA biyogenezinde görevli *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *AGO1* ve *TARBP2* genlerindeki ekspresyon değişimleri, AML ve MDS gibi miyeloid hematolojik malignansilerin oluşumuna katkı sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Hematolojik malignansiler, miRNA, *Drosha*, *DGCR8*, hematopoez, ekspresyon

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Ertan AY, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EXPRESSION LEVELS OF miRNA BIOGENESIS GENES IN MYELOID HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES

Hematological malignancies are malignant neoplasms that affect blood, bone marrow, lymphoid nodes and other parts of lymphatic system. Since myeloid hematological malignancies cause high morbidity and mortality, early diagnosis and effective treatment is very important. Studies about hematological malignancies have been mostly focus on miRNAs. miRNAs are potential regulators of hematopoiesis. In this study, the expression levels of miRNA biogenesis genes *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *XPO5*, *AGO1*, *AGO2* and *TARBP2* were investigated in myeloid hematological malignancies.

In total, 54 patients with diagnosed AML (n=20) and MDS (n=34) and a control group of 7 healthy participants were recruited from Mersin University, Faculty of Medicine Department of Internal Medicine, Hematology Department. After total RNA isolation and cDNA synthesis, miRNA biogenesis genes were analyzed with qPCR method. Expression levels of these genes were evaluated between the total patient (AML and MDS) and control, MDS patients and control, AML patients and control and AML-MDS groups statistically by using the Chi-square test, Shapiro-Wilk test, Student's t-test, Mann-Whitney U test. We could not detect the expression level of *XPO5* and *AGO2* genes in control and healthy groups in Real time PCR so they could not be calculated by statistically.

While the expression levels of *Dicer*, *Drosha*, *AGO1* and *TARBP2* were lower, the level of *DGCR8* was higher in total patients compared to healthy group. Similar results were seen between MDS and healthy group. While there was a significant difference in the expression levels of *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *AGO1* genes between AML and healthy group ($p < 0.05$), *TARBP2* expression level was not changed significantly. Although there were no significant difference in expression levels of *Dicer*, *Drosha*, *DGCR8* and *AGO1* genes, the expression level of *TARBP2* gene was statistically significant between AML and MDS patients.

As a result, the alterations in expression of *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *AGO1* and *TARBP2* genes in the miRNA biogenesis may contribute to myeloid hematological malignancies such as AML and MDS. These genes may prove to be a new biomarker for these malignancies.

Keywords: Hematological malignancies, miRNA, *Drosha*, *DGCR8*, hematopoiesis, gene expression

Advisor: Assistant professor. Mustafa Ertan Ay, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin, Turkey.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, her konuda yardım ve desteğini eksik etmeyen, akademik anlamda bana yol gösteren danışman hocam Dr.Öğr. Üyesi M.Ertan AY'a teşekkür ederim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. M.Emin Erdal'a Prof. Dr. İ. Ömer BARLAS'a, Doç. Dr. Özlem İZCİ AY'a, doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim. Aynı zamanda tez izleme komitemde yer alan ve fikirleriyle tezime katkı sunan Doç.Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Miyeloid hematolojik malignensi tanısı almış bireylerden kemik iliği örneklerinin toplanmasını organize eden ve çalışmamıza destek veren Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Anıl Tombak ve hematoloji kliniği çalışanlarına teşekkür ediyorum.

İstatistiksel analizlerin yapılmasında yardımcı olan Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Ana Bilim Dalı'ndan Arş. Gör. Havva Didem Çelikcan'a, yazım aşamasında verdiği destek için değerli arkadaşım Arş. Gör. Ümit KARAKAŞ'a ve her türlü desteklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Hayatımı birleştirmekten onur duyduğum, her şartta gösterdiği sevgi ve sabır için sevgili eşime, yaşama sevincim olan oğlum Çınar'a teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLOLAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI.....	3
2.1.Hematopoez.....	3
2.3. Myeloid Hematolojik Malignansiler.....	6
2.4. Miyelodisplastik Sendrom.....	7
2.4.1. MDS'nin Tarihçesi.....	7
2.4.2. MDS Epidemiyolojisi ve Tanısı.....	9
2.4.3. MDS'nin Sınıflandırılması.....	9
2.4.4. MDS'nin Patofizyolojisi.....	11
2.4.4.1. Sitogenetik Bulgular.....	11
2.4.4.2. MDS'de Somatik Gen Mutasyonları.....	14
2.4.4.2.1.MDS Hastalarında RNA Splayzing Mekanizmasında Meydana Gelen Mutasyonlar.....	16
2.4.4.2.2. MDS'de DNA Metilasyonu ve Kromatin Modifikasyonu.....	18
2.4.4.2.3.MDS'de Transkripsiyonel Faktörler.....	20
2.4.4.2.4.MDS'de Kohezyon kompleksleri.....	21
2.4.4.2.5.MDS'de Sinyal İleti Yolakları.....	22
2.4.4.2.6.MDS'de TP53 Aktivasyon ve Mutasyonu.....	23
2.4.5. Hastalığın Prognozu.....	24
2.5. Akut Miyeloid Lösemi.....	26
2.5.1. AML'nin Tarihçesi.....	26
2.5.2. AML'nin Epidemiyoloji.....	27
2.5.3. AML'nin Sınıflandırılması.....	28
2.6. Mikro RNA'lar.....	31
2.6.1. miRNA'ların Keşfi ve Genomik Lokalizasyonu.....	32
2.6.2. miRNA Biyogenezi:.....	33
2.6.2.1. Klasik miRNA Biyogenez Yolağı.....	33
2.6.2.1.1. pri-miRNA'ların Transkripsiyonu.....	34
2.6.2.1.2. Mikroişlemci Kompleksi Tarafından pri-miRNA'nın İşlenmesi.....	34
2.6.2.1.3. pre-miRNA'ların Sitoplazmaya Transferi.....	37
2.6.2.1.4. pre-miRNA'nın Dicer Tarafından Sitoplazmik Kesimi.....	38
2.6.2.1.5. RISC Kompleksinin Oluşumu ve Fonksiyonları.....	39
2.6.2.2. Klasik Olmayan miRNA Biyogenez Yolağı:.....	41
2.7. miRNA'lar ve Miyeloid Hematolojik Malignansiler.....	42
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	45
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması.....	45
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	45
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	45
3.2.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler.....	46
3.3. Kemik İliğinden RNA eldesi.....	46
3.4. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve cDNA sentezinde kullanılacak RNA kalıp miktarlarının belirlenmesi.....	47
3.5. cDNA Sentezi.....	47

3.6. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi	49
3.6.1. Primer ve Prob Dizaynı	50
3.6.2. Real time kantitatif PCR ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi (qPCR)	52
3.6.3. qPCR Verilerinin Analizi	52
3.7. İstatistiksel Analiz.....	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	55
4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi	55
4.1.1. Hasta Grubu	55
4.1.2. Kontrol Grubu	56
4.2. Toplam Hasta ve Kontrol Gruplarında Dicer, Drosha, DGCR8, XPO5, AGO1, AGO2, TARBP2, Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Analizi	57
4.2.1. Dicer Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	62
4.2.2. Drosha Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	63
4.2.3. DGCR8 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	64
4.2.4. AGO1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	65
4.2.5. TARBP2 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	66
4.3. MDS Hastaları ve Kontrol Grubu Arasında Gen Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	67
4.4. AML Hastaları ve Kontrol Grubu Arasında Gen Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	68
4.5. MDS ve AML Hasta Grupları Arasında Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi	69
4.6. Tartışma.....	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ.....	99

Tablo 2.1. MDS'nin tarihsel terminolojisi	8
Tablo 2.2. MDS'de FAB Sınıflandırması	10
Tablo 2.3: Uluslararası Skorlama Sisemi.....	25
Tablo 2.4: Revize Edilmiş Uluslararası Skorlama Sistemi.....	26
Tablo 2.5: AML'de FAB sınıflaması [103].....	28
Tablo 2.6. AML'de WHO Sınıflaması.....	30
Tablo 2.7. AML'de sık görülen mutasyonlar	31
Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu için 1. karışım	48
Tablo 3.2. cDNA reaksiyonu için 2. karışım	48
Tablo 3.3. miRNA biyogenez yolağında görevli genlere ait primer-prob dizileri	51
Tablo 3.4. Real-time-PCR gen ekspresyonu için kullanılan solüsyon ve miktarları.....	52
Tablo 4.1. Kontrol ve hasta gruplarındaki kadın ve erkeklerin yaş ortalaması.....	55
Tablo 4.2. Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının cinsiyet açısından değerlendirilmesi	56
Tablo 4.3. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi	56
Tablo 4.4. Kontrol ve hasta gruplarında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri ($Q1=\%25$, $Q3=\%75$).....	57
Tablo 4.5. Hasta Grubunda Real-time Sonucu İlgili Genlere ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri	59
Tablo 4.6. Kontrol Grubunda Real-time Sonucu İlgili Genlere ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri	60
Tablo 4.7. MDS ve Kontrol grubu arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri ($Q1=\%25$, $Q3=\%75$).....	67
Tablo 4.8. AML ve Kontrol grubu arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri ($Q1=\%25$, $Q3=\%75$).....	68
Tablo 4.9. AML ve MDS hasta gruplarında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri ($Q1=\%25$, $Q3=\%75$).....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Hematopoietik kök hücrenin özellikleri, HSC: hematopoietik kök hücre	4
Şekil 2.2. Hematopoietik hiyerarşi	5
Şekil 2.3. MDS'de yaygın görülen kromozomal anomalilerin prognozu ve insidansı	14
Şekil 2.4. MDS'nin klonal yapısı ve AML gelişimi	16
Şekil 2.5. MDS'de epigenetik düzenlenmeden sorumlu genleri etkileyen tekrar eden somatik mutasyonlar	20
Şekil 2.6: MDS ile ilişkili moleküler yolaklar ve gen mutasyonları.....	23
Şekil 2.7. miRNA alanındaki önemli buluşların kronolojik sıralaması ve kanserle ilişkisi	33
Şeki 2.8. pri-miRNA'nın yapısı	35
Şekil 2.9: Drosha domainleri ve miRNA biyogenezindeki görevleri	35
Şekil 2.10: İnsan DGCR8 domainleri	36
Şekil 2.11: pri-miRNA işlenmesinde mikroişlemci kompleksi	37
Şekil 2.12: Dicer domain organizasyonu	38
Şekil 2.13: miRNA-mRNA etkileşimi	40
Şekil 2.15: Klasik ve klasik olmayan miRNA biyogenez yolağı	41
Şekil 3.1. Real-time-PCR'in dört fazı	49
Şekil 3.2. Real-time PCR'da endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin ve hedef genin ekspresyon eğrisi. Kırmızı renkli yatay çizgi ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını, mavi renkli FAM ve yeşil renkli VIC eğrisi ise ekspresyon düzeyini ifade etmektedir	53
Şekil 4.1. Kontrol ve hasta grupları arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2'nin ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	58
Şekil 4.2. Real-time PCR'da AGO2 genine ait ekspresyon eğrisi. Kırmızı renkli yatay çizgi ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını, mavi renkli FAM ve yeşil renkli VIC eğrisi ise ekspresyon düzeyini ifade etmektedir	61
Şekil 4.3. Real Time PCR'da ABI kontrol RNA'sına ait β -aktin (VIC boyası) ve hedef genin (FAM boyası) ekspresyon eğrisi	61
Şekil 4.4. Kontrol ve hasta grubunda Dicer genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	62
Şekil 4.5. Real-time PCR'da Dicer (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.....	62
Şekil 4.6. Kontrol ve hasta grubunda Drosha genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	63
Şekil 4.7. Real-time PCR'da Drosha (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.....	63
Şekil 4.8. Kontrol ve hasta grubunda DGCR8 genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi.	64
Şekil 4.9. Real-time PCR'da DGCR8 (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.....	64
Şekil 4.10. Kontrol ve hasta grubunda AGO1 genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	65
Şekil 4.11. Real-time PCR'da DGCR8 (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.....	65
Şekil 4.12. Kontrol ve hasta grubunda TARBP2 genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi	66
Şekil 4.13. Real-time PCR'da TARBP2 geni (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.	66
Şekil 4.14. MDS ve kontrol gruplarında ilgili genlere ait ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	67

Şekil 4.15. AML ve kontrol gruplarında ilgili genlere ait ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	69
Şekil 4.16. AML ve MDS hasta gruplarında ilgili genlere ait ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi	70



KISALTMALAR ve SİMGELER

°C	:Santigrat derece
µg	:Mikrogram
µl	:Mikrolitre
3'-UTR	:3'-Untranslated Region (Translasyonu Yapılmayan 3' Bölge)
AGO1	:Argounate Protein 1
AGO2	:Argounate Protein 2
AML	:Akut Miyeloid Lösemi
ALL	:Akut Lenfoblastik Lösemi
ASXL1	:Additional Sex Combs Like 1
BHQ	:Black Hole Quencher
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DGCR8	:Di George Syndrome Critical Region Gene 8
DNMT	:DNA metiltransferaz
dNTP	:Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	:Etilendiamintetraasetikasit
ETV6	:ETS-varyant geni 6
EZH2	:Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2
FAB	:Fransız, Amerikan, İngiliz grubu
IDH 1	:Isocitrate dehydrogenase 1
IDH 2	:Isocitrate dehydrogenase 2
IPSS	:International Prognostic Scoring System
IPSS-R	:Revised International Prognostic Scoring System
KLL	:Kronik Lenfositik Lösemi
KML	:Kronik Miyeloid Lösemi
KMML	:Kronik Miyelomonositik Lösemi
MDS	:Myelodisplastik Sendrom
mg	:Miligram
MLL5	:Mixed lineage leukemia 5
MPN	:Myeloproliferatif neoplazmalar
mRNA	:Messenger RNA
miRNA	:mikro Ribonükleik Asit
RA	:Refrakter anemi
RAEB	:Blast artışı olan refrakter anemi
RAEB-T	:Transformasyonda Blast Artışlı Refrakter Anemi

RARS	:Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi
ng	:Nanogram
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
PRC	:Polycomb-represif kompleks
PDGFRB	:Trombosit kökenli büyüme faktör reseptör beta zincir
RISC	:RNA-indüklü sessizleştirme kompleksi
RRM	:RNA'yı tanıyan motif domaini
RUNX1	:Runt Related Transcription Factor 1
SF3B1	:Splicing factor 3b subunit 1
SRSF2	:Serine and arginine-rich splicing factor 2
TET2	:Ten Eleven Translocation gene 2
TARBP2	:TAR RNA bağlama proteini 2
U2AF1	:U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
XPO5	:Eksportin 5
ZNA	:Zip nucleic acids
ZRSR2	:Zinc finger CCCH type, RNA-binding motif and serine/arginine rich 2

1. GİRİŞ

Hematolojik malignansiler, kemik iliği ve lenf nodlarından köken alan kanserlerin farklı bir grubunu oluşturmaktadır. Tüm yaş gruplarını etkilese de yaşlı bireylerde hastalığın insidansı artmaktadır. Miyelom, lenfoma ve lösemilerin oluşturduğu hematolojik malignansiler, her yıl Amerika'da yeni tanı konan kanser vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır ve insidansı giderek artmaktadır [1]. Erkeklerde prostat, akciğer ve kolorektal, kadınlarda ise meme, akciğer ve kolorektal kanserlerinden sonra en sık görülen kanser türüdür ve günümüzde insan sağlığını etkileyen en önemli problemlerden biridir. Hastalığın insidansının giderek artması ve patofizyolojisinin tam olarak anlaşılamaması, bu hastalık grubuyla yapılan çalışmaların gerekliliğini ve önemini açıkça ortaya koymaktadır [2].

Miyeloid öncü hücrelerin farklılaşmasının bozulması ve anormal proliferasyonu ile karakterize olan Akut miyeloid lösemi (AML), yetişkinlerde en sık görülen akut lösemidir ve Amerika'da insidansı 100.000'de 3 ila 5 arasında değişkenlik göstermektedir [3,4]. Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ise kompleks ve heterojen yapısının yanında AML'ye dönüşüm riski olan klonal miyeloid hematolojik malignensi özelliği taşımaktadır. Genellikle ileri yaş hastalığı olarak tanımlanan MDS, AML'ye oranla daha sık görülmektedir. Kromozomal aberasyonlar ve gen mutasyonlarına ek olarak DNA metilasyonu, histon asetilasyonu ve RNA aracılı gen susturma mekanizması gibi epigenetik değişimler her iki malignensi türünün patogenezinde önemli role sahiptir [5]. Hastalıkların patogenezinde ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde ilerlemeler kaydedilmiş olsa da hastaların yaşam süresini uzatmada ve klinik sonuçları öngörmede hala birtakım kısıtlamalar söz konusudur [3].

Son yıllarda, hematolojik malignansilerin moleküler etiyolojisinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, miRNA'lar üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok araştırma, hematolojik kanserlerinin oluşumu ve ilerlemesinde miRNA'larda meydana gelen değişimlerin rol aldığını ortaya koymuştur [6,7]. miRNA'lar, hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA degradasyonu veya inhibisyonuna yol açan, yaklaşık olarak 22 nükleotid uzunluğundaki kodlanmayan RNA'lardır ve insan genlerinin yaklaşık %30-60'ının post-transkripsiyonel düzenlenmesinde kilit rol oynarlar.

miRNA'lar, genom üzerinde protein kodlayan intron veya ekzon bölgeleri ve protein kodlamayan bölgelerdeki RNA genlerinden transkribe edilirler. miRNA biyogenezindeki ilk basamak, miRNA'ların RNA polimeraz II tarafından primer miRNA (pri-miRNA) olarak adlandırılan uzun RNA prekürsörlerine transkripsiyonudur. pri-miRNA nükleusta bir Rnaz III enzimi olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlama proteini olan DGCR8 ile sap-ilmek yapısında olan 70 nükleotidlik pre-miRNA'ya dönüştürülür. Drosha-DGCR8 kompleksine mikroprekürsör kompleksi de denir ve bu kompleks miRNA olgunlaşmasında oldukça önemlidir. Pre-miRNA'lar, RAN-GTP bağımlı transporter olan Exportin 5 ile sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmada, diğer bir

Rnaz III enzimi olan Dicer, pre-miRNA'ların miRNA'ya dönüşümünü katalizler. Dicer, pre-miRNA'nın sap ilmek kısmını keserek 21-24 nükleotid uzunluğunda dubleks miRNA oluşumuna yol açar. Olgun miRNA'lar, TAR RNA-bağlama proteini 2 (TARBP2) ile ilişkili olan Argonaute 1 ve 2 (AGO1 ve AGO2) proteinin katılımıyla RNA-indüklü susturma kompleksini (RISC) oluştururlar ki bu kompleks mRNA'ların degradasyonu ve represyonunda kritik rol oynar. miRNA biyogenezindeki kilit rolleri dikkate alındığında *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *XPO5*, *AGO1*, *AGO2* ve *TARBP2* genlerinde meydana gelebilecek genetik veya epigenetik değişimler direkt miRNA ekspresyonu etkileyeceğinden birçok hastalığın patogenezinde rol oynayabilir [8,9].

Hematopoezde, hematopoietik kök hücrelerin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki denge oldukça önemlidir ve bu dengenin korunmasında çok çeşitli moleküllerin görev aldığı bilinmektedir. Bu moleküllerden biri olan miRNA'lar hematopoezde kritik rol oynayan düzenleyici moleküllerdir. Örneğin; miR-223, granülopoezi düzenlerken, miR-221 ve miR-222 eritropoezi kontrol etmektedir. Bunun yanı sıra miR-146, miR-150 ve miR-181, B-lenfosit oluşumunu indüklemektedir. Bu nedenle bu miRNA'ların ekspresyonunda meydana gelen anomaliler, AML, MDS gibi hematolojik malignansilerin oluşumuna aracılık etmektedir [2]. miRNA fonksiyonunu etkileyen nedenler arasında miRNA biyogenez yolağında yer alan genlerin ekspresyon düzeyindeki değişimler de gösterilmektedir.

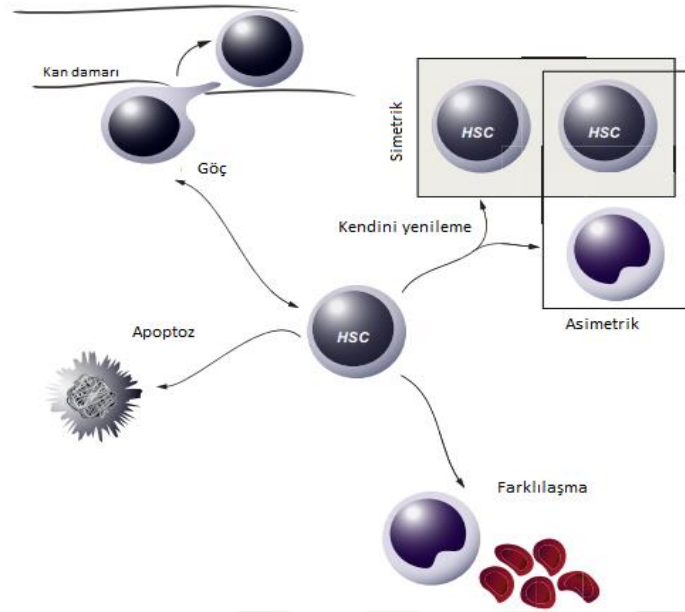
MDS'nin oluşumu, ilerlemesi ve AML'ye dönüşüm sürecinde rol oynayan moleküler mekanizmanın aydınlatılması, hem hastalığın teşhisinde hem de prognozunun daha iyi anlaşılmasında yol gösterici olabilir. Aynı zamanda bu moleküler mekanizmanın tanımlanması neticesinde etkin tedavi protokolleri kullanılarak hastalıkla mücadele sağlanabilecektir. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda, miyeloid hematolojik malignensi grubunda yer alan AML ve MDS hastalarında miRNA biyogenez yolağında yer alan *DGCR8*, *Drosha*, *XPO5*, *Dicer*, *TARBP2*, *AGO1* ve *AGO2* genlerinin ekspresyon düzeyleri araştırıldı. miRNA'ların literatürde bazı hastalıklarda biyobelirteç olarak kullanımı göz önüne alındığında özellikle miRNA biyogenez yolağında görevli genlerin ekspresyon düzeylerindeki olası değişimlerin yeni ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi konusunda yol gösterici olabileceği kanısındayız.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1.Hematopoez

Hematopoez, kemik iliğinde bulunan multipotent özellikteki hematopoietik kök hücrelerin farklılaşarak kanın tüm hücresel bileşenlerini oluşturmasıdır. Yüksek hücresel dönüşüm gösteren dokularda organ fonksiyonunun korunmasında kök hücre popülasyonu oldukça önemlidir. Kök hücre terimi ilk olarak Till ve McCulloch tarafından 1961’de in vitro kan hücrelerinin rejenerasyonu çalışmalarında ortaya atılmıştır. Sınırlı sayıda kemik iliği hücrelerinin radyasyona maruz bırakılmış alıcı farelere transplantasyonunu takiben 10 gün sonra farelerin karaciğerinde hücresel koloniler gözlenmiştir. Bu kolonilerin analizi, donör kemik iliği hücrelerinde çok küçük bir popülasyonda iki özelliğin ortaya çıkmasına neden olmuştur: Çok çeşitli miyeloid hücrelerin oluşumu ve bu hücrelerin kendilerini yenileme kapasitesi göstermesi [10,11]. Barsak, epidermal epitel ve hatta kan hücreleri olmak üzere bazı kendini yenileyen dokularda somatik kök hücreler tanımlanmıştır. Kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücreler, bölünme esnasında ya da bölündükten sonra bazı seçeneklerle veya durumlarla karşılaşır. Bunlar olasılıkla:

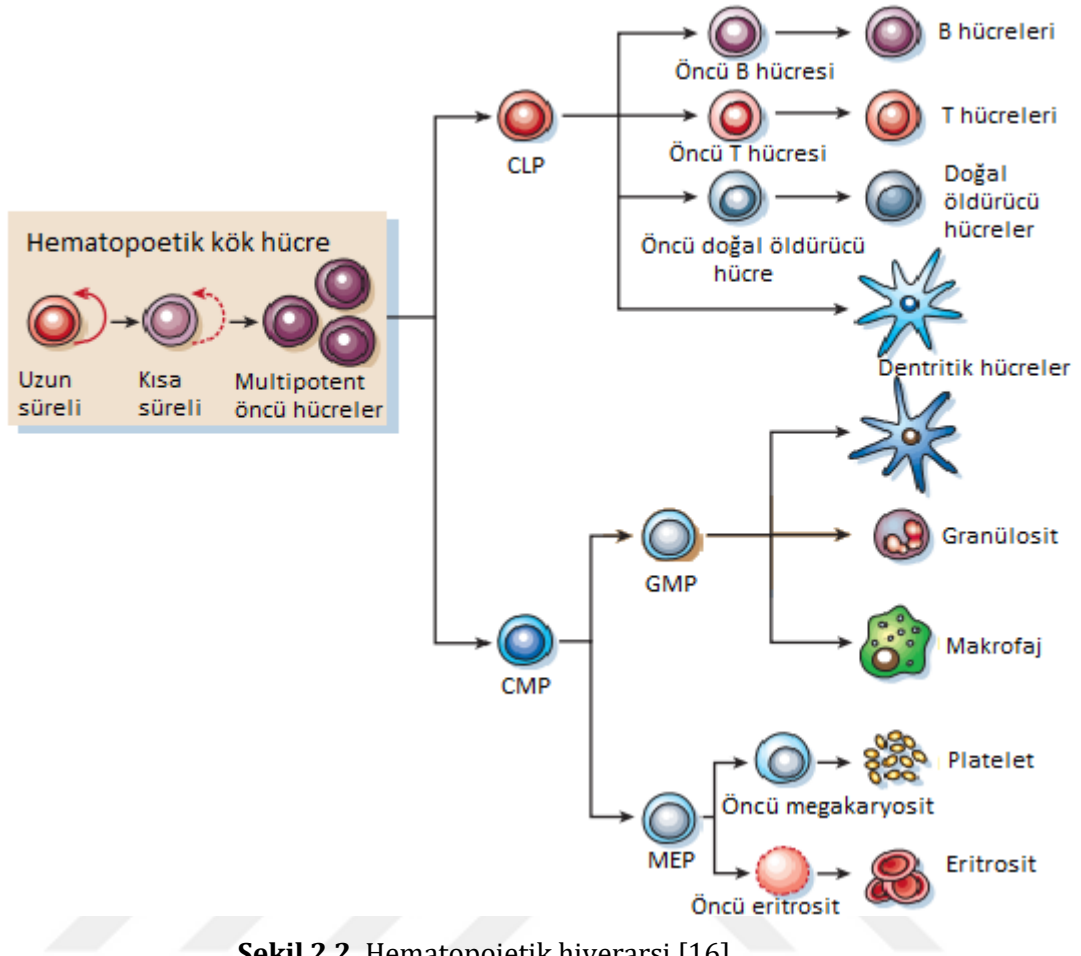
- 1) Kendini yenileme; simetrik veya asimetrik olabilmektedir. Simetrik bölünme kök hücre özelliğine sahip iki hücre oluşumu ile sonuçlanır ve böylelikle kök hücre havuzu artar. Asimetrik bölünmede ise yavru hücrelerden biri kök hücre özelliğine sahipken, diğer hücre ise farklılaşma özelliğine sahip öncü hücredir ve böylelikle hem kök hücre havuzu korunur hem de farklı kan hücrelerinin oluşumu sağlanır.
- 2) Farklılaşabilir veya apoptoza gidebilir.
- 3) Kemik iliği içindeki veya dışındaki diğer bölgelere göç edebilir [12] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hematopoietik kök hücrenin özellikleri, HSC: hematopoietik kök hücre [12]

Hematopoietik kök hücreler, kemik iliğinde düşük bir yüzdede bulunurken (%0,01-0,05), periferik kanda ise bu oran %0,001 olup daha düşüktür. Sitokinler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri ve mikroçevre, hematopoezin düzenlenmesinde kilit rol oynarlar.

Tüm olgun kan hücreleri ve öncü hücrelerin hematopoietik kök hücreden köken alması, yetişkin hematopoez hiyerarşisinde hematopoietik hücrelerin en üstte olmasına olanak sağlar. Tüm hematopoietik hücreler aynı değildir. Kendini yenileme potansiyellerine göre; uzun süreli ve kısa süreli olmak üzere 2 tip hematopoietik kök hücre vardır [13,14]. Uzun süreli hematopoietik kök hücreler, bir organizmanın yaşamı boyunca kendini yenilemeye devam eder. Kısa süreli hematopoietik kök hücreler ise yaklaşık 6-8 hafta süren kendini yenileme potansiyeline sahiptir. Hiyerarşik ortamda bu hücrelerden sonra gelen multipotent öncü hücreler ise çok yönlü farklılaşma kapasitesine sahipken, kendini yenileme potansiyelinin olmaması nedeniyle kök hücre kapsamına girmezler. Bu öncü hücreler hematopoietik hücre hatlarına farklılaşmaya devam ederler. Yaygın miyeloid öncü hücre (CMP, common miyeloid progenitor), her biri sırasıyla platelet, eritrosit, granülosit, makrofaj ve dentritik hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip megakaryositik/eritroit öncü hücreler (MEP) ve granülosit/monosit öncü hücreler (GMP) olmak üzere 2 oligopotent hücre tipini oluştururlar. Lenfoid hücre hattını ise B, T, doğal öldürücü ve dentritik hücreleri oluşturma potansiyeline sahip yaygın lenfoid öncü hücre (CLP) oluşturur [15,16] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hematopoietik hiyerarşi [16].

2.2. Anormal Hematopoez ve Hematolojik Malignansiler

Hematopoietik kök hücrelerin sayısı, kemik iliği mikroçevresindeki koşullar, proliferasyon ve apoptoz sonucu belirlenir. Hematopoezi kontrol eden moleküler mekanizma tam olarak açıklığa kavuşturulamazken, kan hücrelerinin homeostatik üretiminden sorumlu mekanizmalardan bazıları yakın zamanda ortaya çıkmıştır. Yapılan bir çalışma, hematopoietik kök hücrelerin fonksiyonunun korunmasında iki büyük moleküler mekanizmanın rol oynadığını göstermiştir. Bunlar; Hücre içi süreçler (hücre siklus düzenleyicileri ve fosfatidil inozitol 3-kinaz yolağı gibi) ve hücre dışı gelişim yolları (transforme edici büyüme faktörü, Wnt, Hedgehog ve Notch sinyal yolları)'dır. Bu düzenleyici yolların fonksiyonlarını yerine getirememeleri yani hematopoezdeki kontrol mekanizmalarının ortadan kalkması, hematolojik kanserlerin gelişimine neden olmaktadır. Kan kanserleri, kan hücrelerinin azalması ve öncü ve hematopoietik kök hücreler tarafından yerine yenilerinin konması arasındaki homeostatik dengeyi bozan patojenik bir olaydan kaynaklanır [17].

Hematolojik malignansiler, miyeloid ve lenfoid olmak üzere 2 farklı hücre serisinden köken alırlar. Lenfatik lösemi ve miyelomlar, lenfatik hücre hattından köken alırken, Akut

Miyeloid Lösemi (AML), Kronik Miyeloid Lösemi (KML) ve Miyelodisplastik Sendromlar ise miyeloid hücrelerden köken almaktadırlar [18,19]. Miyeloid hücre hatlarından eritrosit, trombosit, granülosit, mast hücreleri ve makrofajlar oluşurken, lenfoid hücre hatları B, T, naturel killer (NK) ve plazma hücrelerini oluşturmaktadır [20]. Hematolojik malignansilerin sınıflandırma sisteminde hücre morfolojisi, immünofenotip, genetik ve klinik kriterler ön planda yer almaktadır. Tüm kanser vakalarının yaklaşık olarak %9'unu oluşturmaktadırlar. Tüm yaş grubundaki bireyleri etkilemekle birlikte, özellikle yaşlı bireyler arasında hastalığın insidansı en yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Bu malignansilerin prevalansı batı ülkelerine kıyasla Asya ve Avrupa ülkelerinde daha düşük iken, düşük ve orta gelirli ülkelerde ise insidansı giderek artmaktadır [21,22]. Hematolojik malignansilerin insidansında coğrafya, yaş, etnik köken gibi faktörlerin değişkenlik göstermesi bu malignansilerin gelişiminde farklı etiyolojik faktörlerin rol alabileceğini ileri sürmektedir. Hematolojik malignansiler, yüksek morbidite ve mortaliteye yol açtığından erken tanı ve etkili tedavi oldukça önemlidir. Her ne kadar hematolojik malignansilerin biyolojisini anlamakta ve yeni tedavi yöntemlerinin gelişiminde yol katedilmiş olsa da hala çok sayıda bilgi ve çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Tek bir molekülü hedef alan tedavi yöntemleri (KML gibi birkaç vaka dışında) istenilen sonuçları vermemekle birlikte hastaların büyük kısmı hastalığın tekrar nüksetmesi sonucu hayatını kaybetmektedir. Hastalığın etiyolojisini anlamamızı güçleştiren nedenler arasında; yeni hedef genlerin henüz tanımlanamamış olması, genetik ve epigenetik değişimlerdeki karmaşıklık ve kilit sinyal yollarındaki moleküllerin eksikliği ya da fazlalığı yer almaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerinin sınırlı olması, hastalığın erken tanısında yeni biyomarkırların keşfini zorunlu kılmaktadır [18].

2.3. Myeloid Hematolojik Malignansiler

Miyeloid hematolojik malignansiler, değişken prognoz gösteren hematopoietik hastalıkların kompleks ve heterojen bir grubunu oluşturmaktadır. Miyeloid seri hücrelerinde, kendini yenileme, proliferasyon ve farklılaşma gibi kilit süreçlerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimler sonucu oluşurlar. Miyeloid malignansilerin biyolojisinde genetik faktörlerin rolünü anlamada yol katedilmesine karşın, bu hastalıkların sınıflandırılmasında çeşitli problemler yaşanmıştır. FAB sınıflamasında miyeloid malignansiler 3 kategoriye ayrılmıştır: Akut miyeloid lösemiler, miyelodisplastik sendromlar ve miyeloproliferatif hastalıklar. Blast sayısı, köken aldığı hücre ve neoplastik hücrelerin farklılaşma düzeyleri, morfolojik, sitokimyasal ve immünofenotip özelliklerine göre tanımlanan bu kategorilerin major belirleyici faktörleridir. Son zamanlarda genetik faktörlerin (sitogenetik ve moleküler genetik) bu hastalıkların kliniğinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Son olarak miyeloid hematolojik malignansiler patoloğlar tarafından miyeloproliferatif hastalıklar, miyelodisplastik/miyeloproliferatif

hastalıklar, miyelodisplastik sendromlar ve akut miyeloid lösemiler olmak üzere 4 ana grupta sınıflandırılmıştır [23,24].

2.4. Miyelodisplastik Sendrom

Miyelodisplastik Sendrom (MDS), hematopoietik kök hücrelerden köken alan malignensilerin klonal ve heterojen bir grubunu oluşturmaktadır. Kemik iliğinde inefektif, displastik hematopoez ve periferik kanda değişkenlik gösteren sitopeni derecesi ile karakterizedir [25]. MDS'de en yaygın görülen özellikler [26]:

- I. Bir veya daha fazla hücre hattında görülen morfolojik displaziler
- II. Periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde %20'den daha az görülen blast yüzdesi
- III. De novo vakaların yaklaşık %90'ında görülen sitogenetik ve moleküler anomaliler
- IV. AML'ye dönüşme riski

MDS hastalarının %36'sında AML gelişimi gözlenmektedir. Kemoterapi veya radyoterapi ile AML gelişimini önlemek zordur [27]. MDS vakalarının büyük kısmı (%80-90) de novo (primer MDS) olarak gerçekleşir. Hastalık, benzen, sigara dumanı, insektisidler ve pestisitlere maruziyet aynı zamanda genetik yatkınlık ve yaşa bağımlı kemik iliği fonksiyon kaybı gibi durumlarda da ortaya çıkabilir. Vakaların geri kalan %10-20'lik kısmı, radyasyon veya başta alkileyici ajanlar olmak üzere mutajenik kemoterapötik ajanlara maruziyet ile ilişkili olarak sekonder MDS şeklinde değerlendirilir. Aplastik anemi, Fankoni anemisi, Shwachman–Diamond Sendromu, Ağır konjenital nötropeni, Diamond–Blackfan anemi gibi nadir görülen kalıtsal kemik iliği yetmezlik sendromları da pediatrik MDS popülasyonlarını oluştururlar. Hastalığın moleküler mekanizmasına bağlı olarak bazı tedavi yöntemleri geliştirilmiş olsa da allojenik kemik iliği transplantasyonu, bu hastalıkların tedavisinde tek yol olarak değerlendirilmektedir. MDS insidansının giderek artması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Sitopeni içeriği ve AML gelişimine bağlı olarak hastaların yaşam süresi birkaç aydan birkaç yıla kadar değişkenlik göstermektedir. Yüksek riskli hastaların ortalama yaşam süreleri 1 yıldan da daha azdır. Bu hastalar kanama, enfeksiyon veya anemiye bağlı olarak kaybedilmektedir [25,28].

2.4.1. MDS'nin Tarihçesi

MDS, tıp literatüründe son 70 yılda en az 16 farklı isimle tanımlanmıştır (Tablo 2.1). İlk isimlendirmeler genellikle anemiye vurgu yaparken, son yıllarda yapılan isimlendirmeler ise neoplastik veya preneoplastik durumları tanımlamaya odaklanmıştır [29]. MDS ilk olarak 1900 yılında Leube tarafından "lökanemi" (akut lösemiye dönüşüm gösteren makrositik anemi) olarak adlandırılmıştır [30]. 1938 yılında Rhoades ve Barker, demir, B12 vitamini veya folik asite yanıt

vermeyen anemik hastaları tanımlamak amacıyla Refrektar Anemi (RA) terimini kullanmıştır. 100 RA'lı hastada makrositoz ve lökopeni sıklığına vurgu yaparken, primer vakaları daha önce hematolojik toksinlere maruz kalan hastalardan ayırmıştır [31]. 1940'lı yılların sonlarına doğru, periferik kan sitopenili bazı vakaların AML'ye dönüştüğü (genellikle miyeloid tiplerin) gözlemlenmiş ve böylelikle prelösemi veya prelösemik anemi terimleri kullanılmaya başlanmıştır.

Tablo 2.1. MDS'nin tarihsel terminolojisi

İsim	Yıl
Lökanemi	1900
Refrakter anemi	1938
Prelösemik anemi	1949
Prelösemi	1953
Ringed sideroblastlı refrakter anemi	1956
Refrakter normoplastik anemi	1959
Smoldering akut lösemi	1963
Kronik eritemik miyeloz	1969
Prelösemik sendrom	1973
Subakut myelomonositik lösemi	1974
Kronik myelomonositik lösemi	1974
Hipoplastik akut miyeloid lösemi	1975
Aşırı miyeloblastlı refrakter anemi	1976
Hematopoietik displazi	1978
Subakut miyeloid lösemi	1979
Dismiyelopoetik lösemi	1980
Mielodisplastik sendrom	1982

1956 yılında Bjorkman ve arkadaşları, RA'lı bir grup hastanın sonraki yıllarda kemik iliğinde ring sideroblastlara rastlanmış ve ring sideroblastlı refrakter anemi (RARS) terimini kullanmıştır. Prelösemi tanısı 1970'li yıllara kadar kullanılmış fakat bazı hastalarda akut lösemi gelişimi gözlenmemesi ve sitopeniden kaynaklı komplikasyonlar neticesinde bu hastaların ölmesi, bu terminolojinin anlamını yitirmesine ve yeni alternatif terimlere ihtiyaç duyulduğunu açıkça ortaya koymuştur. 1970'lerde Prelösemik sendrom, Subakut myelomonositik lösemi ve Hipoplastik akut miyeloid lösemi gibi terimler kullanılmaya başlanmıştır. 1982'den itibaren Mielodisplastik sendrom terimi kabul görmüştür. 21. yüzyılın başlarına kadar MDS terminolojisiyle ilgili konular tartışmaların merkezinde yer almıştır [32-34].

2.4.2. MDS Epidemiyolojisi ve Tanısı

2001 yılında Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) gibi uluslararası kanser enstitüleri MDS'nin insidans oranları hakkında bilgiler sunmaya başlamıştır [35]. 2001-2003 yılları arasında elde edilen bulgular neticesinde MDS'nin yaşa bağlı insidansının Amerika'da her 100.000 kişide 3,4 olduğunu yani her yıl yaklaşık olarak 10.000 yeni vakanın oluştuğu belirtilmiştir. Beklendiği üzere sonraki 3 sene içerisinde hastalığın insidansının; 2001'de 100.000'de 3,3, 2002 yılında 3,4 ve 2003 yılında 3,6 olacak şekilde artış gösterdiği tespit edilmiştir. 2004 yılında ise bu oran 3,8'e çıkmış ve böylelikle MDS en sık görülen miyeloid hematolojik malignensi olmuştur. Hastalığın Amerika'da görülme insidansı İngiltere, Galler, İsveç, Almanya ve Fransa gibi batı Avrupa ülkelerine benzerlik göstermekle birlikte Japonya'ya kıyasla yüksektir [36]. İlginç bir şekilde Çin ve güney Asya bölgelerinde genç yaşta MDS tanısı konmakta ve MDS'nin bazı alt tiplerine daha az rastlanmaktadır. Bu durumun nedeni tam olarak bilinmese de genetik yapı ve çevresel faktörlerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir [37]. MDS, daha çok bir ileri yaş hastalığıdır ve insidansı giderek artmaktadır [38]. Hastaların %86'sı 60 yaş ve üzerindedir. Bu oran 70 yaş ve üzerinde %20-30 arasında değişkenlik gösterirken, 80 yaş ve üzerinde ise %65-70 civarındadır. Kadınlara oranla erkeklerde ve diğer etnik gruplara kıyasla beyaz ırkta daha sık görülen bir hastalıktır [39]. Hastalığın insidansının belirtilen rakamların üzerinde olduğu ileri sürülmektedir. Çoğu MDS vakalarının yetersiz tanı nedeniyle kanser kliniklerine bildirilmemeleri, MDS'nin bir malignensi olarak tanımlanamaması, poliklinik tarafından sınırlı sayıda raporlama ve çoğu vakada kemik iliği biyopsisi yapılmaması gibi durumlar nedeniyle kesin sayı tam olarak belirlenememektedir [40,41].

2.4.3. MDS'nin Sınıflandırılması

MDS'nin sınıflandırılması son 30-40 yıl içerisinde gelişim göstermiştir [42]. 1976 yılında Dr. John M. Bennet önderliğinde bir grup Fransız, Alman ve İngiliz hematolog, 150 AML ve MDS'li hastaların analizlerine dayalı olarak yaptıkları değerlendirmede, tüm MDS hastalarının AML'ye dönüşüm göstermediği ve çoğunlukla ineffektif hematopoez ve kemik iliği yetmezliği gibi komplikasyonlar sonucu hastalığa yenik düştüğünü rapor etmiştir. Aynı zamanda şimdi MDS olarak adlandırılan Dismiyelopoetik Sendromların tanımı, sınıflandırılması ve AML'den ayırt edilecek özellikleri tanımlanmıştır. Aynı grup 1982'de hastalık için "Miyelodisplastik Sendrom" terimini kullanmaya başlamış ve kemik iliği ve periferik kandaki blastların yüzdesi ve displaziden etkilenen hücre hatları baz alınarak sınıflandırma yapılmış ve tanı konmuştur [43]. MDS 5 alt tipe ayrılmıştır:

- Refrakter Anemi (RA)
- Ring Sideroblastlı Refrakter Anemi (RARS)
- Transformasyonda Blast Artışlı Refrakter Anemi (RAEB-T)
- Blast Artışlı Refrakter Anemi (RAEB)
- Kronik Miyelomonositik Lösemi (KMML)

Bu gruplardan RA ve RARS (kemik iliğindeki blast miktarı <5%) MDS başlangıcı olarak tanımlanır. Bu hasta grubunda ortalama sağkalım daha uzundur ve AML'ye dönüşüm diğer alt gruplara oranla daha düşüktür. RAEB-T ve RAEB (kemik iliğindeki blast yüzdeleri 5-20, 21-30) alt grupları ise ileri MDS evrelerini ifade etmektedir. Ortalama sağ kalım süreleri daha kısa ve AML'ye dönüşüm riski yüksektir. KMML ise heterojen bir gruptur ve blast yüzdesi bakımından geniş bir yelpazeye sahiptir [44] (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. MDS'de FAB Sınıflandırması

MDS alt tipi	P.kan blast miktarı (%)	K. iliği blast miktarı (%)	AML'ye dönüşüm (%)	Ortalama sağkalım(ay)	İnsidansı (%)
RA	<1	<5	10-20	30-65	10-20
RARS	<1	<5	10-35	34-83	10-35
RAEB	<5	5-20	>50	8-18	25-30
RAEB-T	>5	21-29	60-100	4-11	10-30
KMML	<5	<20	>40	15-32	10-20

Zaman geçtikçe FAB sınıflamasının bazı konularda yetersiz kaldığı ortaya çıkmıştır:

- Prognostik önemine rağmen kemik iliğinde blast miktarı %5'ten daha az olan hastalardaki displazi derecesinin değerlendirmeye alınmaması,
- Blast yüzdesinin 3 gruba bölünmesi: <5, 5-20 ve >20. %9 blast miktarının prognostik olarak %16 blast miktarından farklılık göstermesi nedeniyle blast yüzdesinin bölünmemesinin daha uygun olabileceği görüşü,
- Dahası, blast yüzdesi 20-30 arasında olan hasta grubunun MDS olarak mı yoksa AML olarak mı değerlendirilmeli konusunun çelişki yaratması ve tek başına morfoloji kriteri göz önüne alındığında bu ayrımın yapılamaması,
- KMML'nin MDS'nin ve miyeloproliferatif neoplazilerin (MPN) tipik özelliklerini taşıması
- Son olarak, FAB sınıflaması morfolojiye dayalı bir sınıflama olduğu için tanımlandığı yıllarda sitogenetik bilgiyi içine almaması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), klinik, morfolojik, sitokimyasal, immünofenotipik ve genetik bilgiler ışığında 2001, 2008 ve son olarak Ağustos 2016'da miyeloid hematolojik malignansilerin sınıflandırmasını yapmıştır [26,43]. 2001 yılında yapılan sınıflandırmada, KMML

miyelodisplastik/miyeloproliferatif hastalıklar olarak ayrı bir başlık altında sınıflandırılmış ve yine FAB sınıflandırmasında yer alan RAEB-T sınıflandırmadan çıkarılıp kemik iliği blastının >20 olması AML olarak tanımlanmıştır. Ek olarak, RAEB grubu blast yüzdesi baz alınarak 2 gruba ayrılmıştır: RAEB 1 (%5-10) ve RAEB 2 (%11-20). 2008 ve son olarak 2016 yılında yapılan sınıflandırmada ise MDS,

- Tekli displazi gösteren MDS (MDS-SLD)
- Çoklu displazi gösteren MDS (MDS-MLD)
- Ring sideroblastlı MDS (MDS-RS)
 - Tek displazi gösteren ring sideroblastlı MDS (MDS-RS-SLD)
 - Çoklu displazi gösteren ring sideroblastlı MDS (MDS-RS-MLD)
- İzole del5q anomali gösteren MDS
- Aşırı blast içeren MDS
 - Aşırı blastlı MDS-1 (MDS-EB-1)
 - Aşırı blastlı MDS-2 (MDS-EB-2)
- Tanımlanamayan MDS (MDS-U)
 - olacak şekilde 6 sınıfa ayrılmıştır [45,46].

2.4.4. MDS'nin Patofizyolojisi

MDS ve AML'nin patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Hücre farklılaşması ve apoptoz mekanizmalarının bozulması, hematopoietik kök hücrede meydana gelen genetik hasarlar neticesinde gerçekleşir. Bu genetik hasarlar, kalıtsal veya sonradan kazanılmış olabilir ama çoğu hastada esas mekanizma tam olarak anlaşılmış değildir. MDS gelişiminde, öncül kök hücrelerde DNA hasarına yatkınlığı arttırarak ikincil genetik aberasyonların birikimine yol açan tetikleyici bir olay gerekmektedir. MDS gelişimindeki temel mekanizmalar:

- Kromozomal anomaliler
- Gen mutasyonları
- Epigenetik değişimler

olarak değerlendirilmektedir [47].

2.4.4.1. Sitogenetik Bulgular

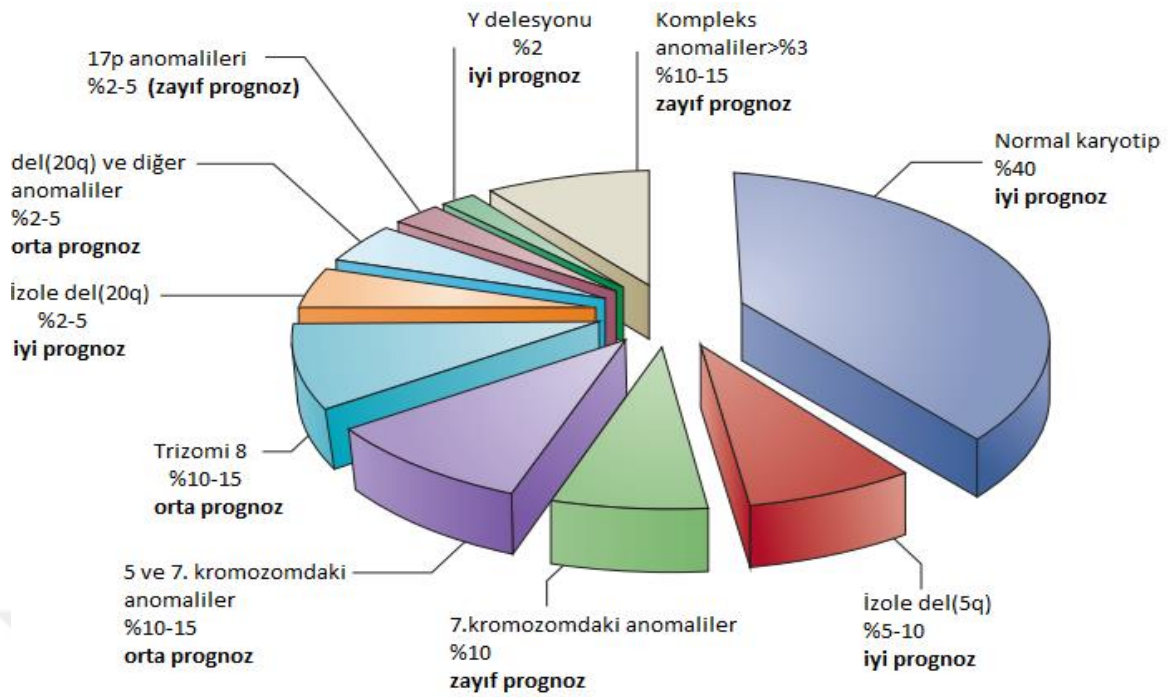
Delesyonlar, monozomiler ve trizomiler, kemik iliğindeki hematopoietik öncül hücrelerin klonal proliferasyonunu tetikler ve bu olaylar MDS'li hastaların çoğunda gözlenir. Primer MDS

hastalarının yaklaşık %50'sinde ve sekonder MDS hastalarının %80'inde kromozomal anomalilere rastlanır. Bu karakteristik anomaliler, çoğunlukla genetik materyal kaybını içerirken, dengeli translokasyonlar ise nadir gözlenmektedir. MDS hastalarının çoğu rekürent karyotipik anomaliye sahiptir. En yaygın görülen anomaliler delesyonlardır ve sıklıkla 5, 7, 11, 13, 20 numaralı kromozomların uzun, 12 ve 17. kromozomların kısa kollarında oluşmakla birlikte MDS vakalarının %10-15'inde görülmektedir. Tek bir sitogenetik anomali olarak değerlendirildiklerinde düşük risk oluşturan bu delesyolar, diğer anomalilerle birlikte MDS riskini arttırmırlar. MDS'de en sık görülen kromozomal değişim, 5. kromozomun uzun kolunun kısmi veya tam delesyonudur. (5q-), total MDS vakalarının %20'sinde görülmektedir. Refrektar makrositik anemi oluşumuna da yol açan 5q- sendromu, farklı klinik ve morfolojik özellikler gösterir. İleri yaş kadınlarda sık görülmekle beraber, normal veya yüksek platelet sayısı, küçük megakaryositler ve iyi prognozla karakterizedir. Kırılma noktaları hastalar arasında değişkenlik göstermektedir ama çoğunlukla 5q31 ve 5q33 bölgeleri arasında gerçekleşmektedir. Sitokin ve reseptörleri, hücre döngüsünü düzenleyen genler, transkripsiyon faktörleri ve sinyal moleküllerinde görevli genler gibi hematopoezin düzenlenmesinde görev alan bazı genler 5. kromozomun uzun kolunda lokalizedir ve bu genlerden bir veya daha fazlasının delesyonu MDS patogenezi açısından önemlidir. Bu genlerden bazılarının homozigot kaybı, 5q delesyonlu miyeloid hastalıkların patogenezinde olası mekanizmalardan birisi olarak değerlendirilmektedir. Örneğin; PURA geni tarafından kodlanan Pur α , transkripsiyon, replikasyon ve hücre büyümesi gibi farklı hücresel ve viral fonksiyonlarda görevli, yüksek oranda korunmuş, ökaryotik DNA ve RNA'ya bağlanabilen bir proteindir. 5q31.1'de lokalize bu genin hemizigot delesyonu MDS ve AML'de sıklıkla gözlemlenmiştir. 5. kromozomdaki anomaliler, amonyak, hidrojen peroksit ve mineral asitler gibi çeşitli inorganik gazlara maruziyet ile ilişkilendirilmiştir [48,49].

Sık görülen diğer bir değişim ise, şiddetli ve refraktar sitopeni ve enfeksiyona yatkınlık ile karakterize olan monozomi 7/del(7q)'dur ve MDS hastalarının %15-20'sinde görülür. Monozomi 7/del (7q) varlığı, bireylerin yaşam süresini azaltır ve yüksek oranda AML'ye dönüşüm riski oluşturur. En yaygın görülen delesyon bölgeleri 7q22 ve 7q32-34'dir. Sırasıyla 7q22 ve 7q36 bölgelerinde lokalize *Mixed lineage leukemia 5* (MLL5) ve *Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2* (EZH2) genlerindeki yarı-yetmezlik (haploinsufficiency) durumu anormal hematopoez ile ilişkilendirilmiştir [50]. Haase ve arkadaşları (2007) tarafından 2124 MDS hastası ile yapılmış oldukları geniş çaplı araştırmada, 2072 hastada sayısal ve yapısal anomalileri saptamıştır. Hastaların yaklaşık %30'unda 5q- kromozomal anomalisi saptanırken, %21'inde ise 7. kromozomdaki karyotipik anomaliler takip ederek toplamda hastaların %52'sinde klonal anomaliler belirlenmiştir. Dahası, 7. kromozomdaki bu anomaliler, kötü prognoz ve ortalama 14 aylık yaşam süresi ile ilişkilendirilmiştir. Bu kromozomda HOXA1 (homebox A)'den HOXA10'a kadar homebox gen ailesinin üyeleri lokalizedir ve transkripsiyon faktörleri kodlayan bu genler

hematopoezde kök hücre farklılaşmasıyla ilişkilidirler. Heinrichs ve arkadaşları (2005), 13 MDS'li hasta ve sağlıklı bireylerle yaptığı çalışmada, 7q36'da lokalize olan *HOXA9* gen ekspresyonunun sağlıklı bireylere oranla MDS'li hastalarda artmış olduğunu rapor etmiştir. *HOXA9* gen ekspresyonunun MDS'de azaldığını gösteren çalışmalara rastlanmamıştır ama bu genin miyeloid farklılaşmasında gerekli olduğu düşünülmektedir [51,52].

Trizomi 8, tek bir kromozomal değişim olarak MDS vakalarının %5'inde görülmektedir ve orta derece prognoz belirteçidir. MDS'de sık görülen diğer bir kromozomal değişim, 20 numaralı kromozomun q24 kolunda meydana gelen delesyondur ve iyi prognoz ile ilişkilidir. Ancak, bu değişim MDS için spesifik değildir. MPN, AML ve lenfoid malignansilerde de görülmektedir [49]. MDS'de füzyon protein oluşuma yol açan bazı translokasyonlar saptanmıştır. Bu translokasyonlar primer ve sekonder MDS vakalarının %3-5'inde görülmektedir. En sık görülen translokasyonlar t(9;11)(p22;q23) ve t(11;16)(q23;p13.3)'dur. t(11;16), çoğunlukla sekonder MDS'de ve nadir de olsa AML'de gözlenmektedir. t(5;12)(q33.1;p13) ise KMML alt tipinde %1 oranında görülür. Bu translokasyon sonucu *trombosit kökenli büyüme faktör reseptör beta zincir (PDGFRB)* ve *ETS-varyant geni 6 (ETV6)* genleri arasında füzyon oluşumu söz konusudur. *PDGFRB* kinaz aktivitesindeki değişimler ve *ETV6* genindeki fonksiyon kayıpları MDS oluşumuna aracılık etmektedir. Özellikle bu transkripsiyonun tespiti *PDGFRB* kinaz inhibitörü olan imatinibe yanıt açısından oldukça kritiktir. Kanser sitogenetik analizinde, 3 veya daha fazla kromozomal anomalinin varlığı kompleks karyotipler olarak tanımlanmaktadır. Primer MDS hastalarının %10'unda ve sekonder MDS hastalarının yaklaşık %90'ında kompleks karyotipler saptanabilmektedir. Kompleks karyotipli çoğu vakada 5,7 veya her iki kromozomdaki anomaliler tanımlanmıştır. Kompleks karyotipin kötü prognoz ile ilişkili olduğu şeklinde genel bir görüş söz konusudur [34]. MDS'de en sık görülen kromozomal anomaliler Şekil 2.3'te verilmiştir. Hematopoezin kontrolünde kritik rol oynayan gen veya gen grubunda meydana gelen delesyonlar veya değişimler, tekrar eden kromozomal anomalili MDS hastalarının çoğunda klinik değişimleri tetikler. Sitogenetik analiz hastalığın tanı, prognoz, sınıflandırılması ve tedavisine katkı sağlamaktadır [53].



Şekil 2.3. MDS’de yaygın görülen kromozomal anomalilerin prognozu ve insidansı [54].

2.4.4.2. MDS’de Somatik Gen Mutasyonları

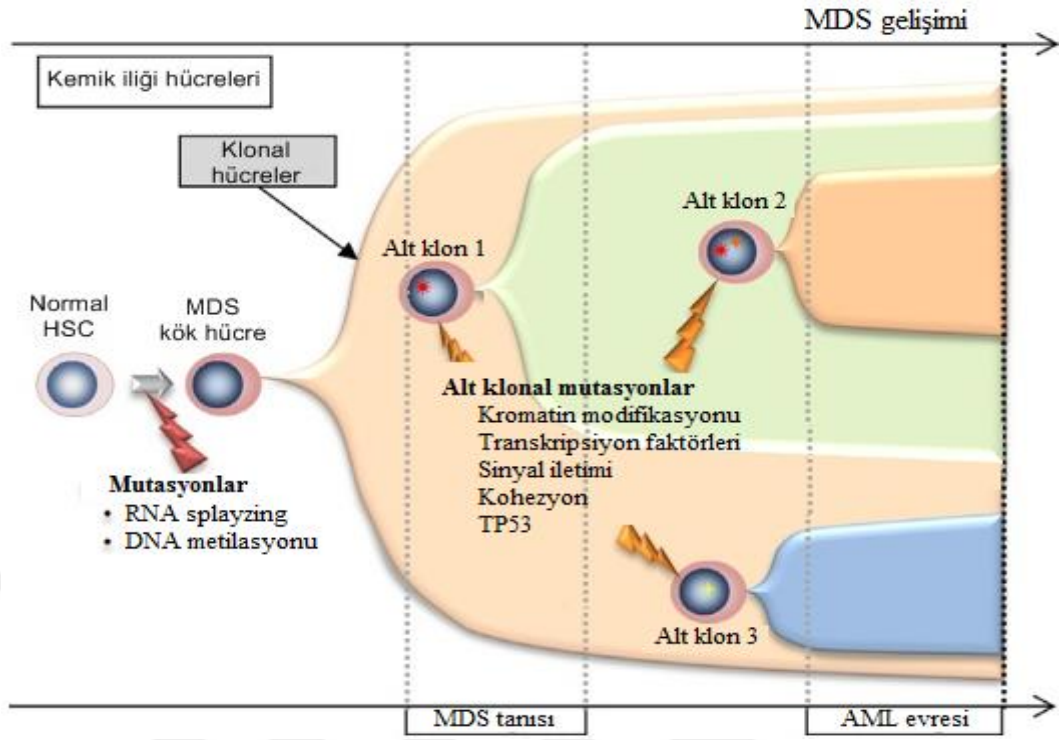
Yeni nesil sekanslama metodları, genetik mutasyonların belirlenmesine öncülük ederek özellikle MDS patogenezinin anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır ve prognoz yüksek oranda genetik anomalilerin keşfine bağlı olarak şekillenmiştir. Birçok DNA metilasyon profileme çalışmaları, MDS etiyolojisinde anormal epigenom varlığını doğrulamıştır. Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, tek nükleotid polimorfizmi ve yeni nesil sekanslama, MDS’nin başlangıcı ve AML’ye dönüşümünde yer alan mutasyonları ortaya çıkarmıştır.

Bejar ve arkadaşlarının 2011 yılında 439 MDS hastasında 111 gen, Papaemmanuil ve arkadaşlarının 2013 yılında 738 MDS’li bireyde 111 gen ve Haferlach ve arkadaşlarının 2014 yılında 944 MDS’li hastada 104 gen üzerinde yaptıkları çalışmalar neticesinde MDS başlangıcı ve AML’ye dönüşümüne bazı genlerde meydana gelen öncü ve “driver” mutasyonların neler olduğunu açıkça ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalar neticesinde;

- MDS’nin yaklaşık 40 gende meydana gelen öncü mutasyonlarla karakterize edildiği ve hastaların yaklaşık 90’ında bir veya daha fazla öncü mutasyonun olduğunu,
- Belirli somatik mutasyonların hastalığın prognozundaki değişimlerle ilintili olduğunu,
- Somatik mutasyonların hastalığın klonal yapısı açısından belirleyici olabileceği konusunda ipuçları vermiştir.

Somatik mutasyonlar, MDS’de yaygın olarak gözlenmektedir ve spesifik klinik özelliklerle ilişkilendirilmektedir. Bu mutasyonlar, gen ürününün yapısını (tek nükleotid polimorfizmi, delesyonlar veya genetik amplifikasyonlar), genlerin ekspresyonunu

(promotor bölgedeki mutasyonlar, epigenetik değişimler) veya onkogen veya tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonunu değiştirebilir [49,55]. Bu mutasyonlar, RNA splayzing, DNA metilasyonu, sinyal ileti yolağı, miyeloid transkripsiyon faktörleri, kromatin modifikasyonu ve kohezyon kompleks bileşenlerini kapsayacak şekilde 6 ana grupta oluşmaktadır. MDS ve AML'nin klonal yapısı, tüm genom sekans analizi ile tüm somatik mutasyonlardaki varyant allel frekansları kullanılarak tanımlanabilir. Bu genomlardaki mutasyonların büyük kısmı yaşlanma sırasında oluşan rastgele yani "passenger" mutasyonlar olarak adlandırılır. Bu mutasyonlar patojenik olmamasına rağmen, alt klonal popülasyonların oluşmasında genetik alt yapı sağlar. MDS'de kemik iliğinde yüzlerce mutasyon taşıyan "founding klon" hastalar AML gelişimi göstermeye başladığında alt klonlara ayrılır. Tekrar eden gen mutasyonlarına hem "founding klon" hem de alt klonlarda rastlanmıştır. Bu mutasyonlar MDS'de biyolojik öneme sahip olmasına rağmen, alt klonlara kıyasla "founding klon" da spesifik gen mutasyonlarının olup olmadığı veya mutasyonların klonal dağılımının klinik veya biyolojik bir öneme sahip olup olmadığı henüz netlik kazanmış değildir. Bununla beraber mutant allel frekanslarının ikili karşılaştırılması yöntemiyle MDS'de genlerin hastalığın hangi evresinde mutasyona uğradıkları ortaya konmuştur. Sonuçlar, RNA splayzing ve DNA metilasyonunun hastalığın erken, kromatin modifikasyonu ve sinyal ileti yolağında yer alan genlerdeki "driver" mutasyonların (alt klonal mutasyonlar) ise hastalığın ileri evrelerinde oluştuğunu ileri sürmektedir [56,57] (Şekil 2.4). Bunlar arasında splayzing mekanizmasında yer alan bileşenlerde meydana gelen mutasyonların en az birinin MDS hastalarının %50'sinden fazlasında keşfedilmesi, MDS patogenezinde bu mutasyonların önemine dikkat çekmektedir [58].



Şekil 2.4. MDS'nin klonal yapısı ve AML gelişimi [56].

2.4.4.2.1. MDS Hastalarında RNA Splayzing Mekanizmasında Meydana Gelen Mutasyonlar

RNA splayzing, mRNA'nın olgunlaşma sürecinde, splaysozom adı verilen bir protein kompleksi aracılığı ile intronların pre-mRNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Splaysozom 5 küçük nükleer ribonükleoprotein ve 200'ün üstünde proteinden oluşan büyük makromoleküler bir komplekstir. İnsan genlerinin %90'ından fazlası, tek bir pre-mRNA transkriptinden çoklu protein izoformunun oluşumuna olanak sağlayan ve böylelikle protein çeşitliliğinde kilit rol oynayan alternatif splayzing mekanizmasına maruz kalmaktadır [59,60]. Splayzing mekanizmasında yer alan faktörlerden çoğunlukla *SF3B1* (splicing factor 3b subunit 1), *SRSF2* (Serine and arginine-rich splicing factor 2), *U2AF1* (U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1) ve *ZRSR2* (Zinc finger CCH type, RNA-binding motif and serine/arginine rich 2) genlerindeki mutasyonlar, MDS hastalarında yüksek oranda görülmektedir [61]. AML ve diğer miyeloproliferatif neoplazilerde nadir görülmeleri nedeniyle MDS-spesifik mutasyonlar olarak adlandırılmaktadırlar. Bu genlerde meydana gelen mutasyonların hücresel fonksiyonlar üzerinde değişik etki göstermeleri, belirli MDS tiplerinde ortaya çıkmaları, MDS fenotiplerinin RNA splayzing mekanizmasındaki değişimlerden kaynaklanabileceği olasılığını akla getirmektedir. Mutant proteinlerin ve hedeflerinin mekanistik önemini ortaya koymak için birçok fonksiyonel çalışma yapılmaktadır. Tüm MDS vakalarının %25'inde saptanan *SF3B1* mutasyonları, en sık MDS-RS alt tipinde (%60-80) görülmektedir. Bu tipteki MDS hastalarının %98'inde prognoz iyidir. En sık görülen *SF3B1*

nokta mutasyonları 14-16 arası ekzonları kapsamaktadır. Heterozigot mutasyonlar 622-700. amino asitler arasında sınıflandırılmıştır [56].

Kromozom 17q25.2'de lokalize olan *SRSF2* geni tarafından sentezlenen SRSF2 proteini, serin-arjinince zengin protein ailesinin bir üyesidir ve RNA'yı tanıyan motif domaini ile (RRM) pre-mRNA'da ekzonik splayzing enhancer (ESE) sekansına bağlanarak alternatif splayzing mekanizmasına katkı sağlamaktadır. SRSF2, SSGN motifiyle pre-mRNA'daki ESE elementlerini tanıyarak ekzon bölgelerinin tanınmasına öncülük etmektedir [62,63]. SRSF mutasyonları, tüm MDS vakalarının %20-30'unda görülmekle beraber, en sık %50 oranla KMML hastalarında saptanmaktadır [64]. KMML-1 ve KMML-2 fenotiplerinde eşit oranda görülmektedir ve KMML tanısında ileri yaş ile ilişkilendirilmiştir [65]. SRSF2 mutasyonlarının büyük çoğunluğu RRM domainine yakın bölgede lokalize olan 95. kodondaki prolini (P95) etkiler. Bu mutasyonu taşıyan MDS hastaların yaşam süreleri daha kısadır ve hızlı bir şekilde AML'ye geçiş gösterirler. SRSF2 P95 mutasyonu MDS gelişiminde önemli bir faktördür. Heterozigot SRSF2 P95 mutasyonu taşıyan farelerin lökopeni, makrositer anemi ve miyeloid displazi gösterdiği ve hematopoietik kök ve öncül hücre artışı ve aynı zamanda apoptozda artış gösterdiği rapor edilmiştir. İlginç şekilde, SRS2 genindeki anomaliler genomik instabilite ile ilişkilendirilmiştir. SRS2 genindeki ekspresyon düzeyinin azalması DNA yıkımına yol açmaktadır [60].

U2AF1, U2 küçük ribonükleoprotein kompleksinin bir üyesidir ve splayz bölgesindeki 3'AG dinükleotidini tanır. MDS vakalarının yaklaşık %11'inde saptanmaktadır. Aynı zamanda AML hastalarının %4'ünde görülmekle beraber akciğer adenokarsinom ve diğer kanser türlerinde de bu mutasyona rastlanılmaktadır. Bu gendeki mutasyonlar MDS hastalarının yaşam süresini kısaltırken, AML'ye dönüşüm riskini arttırmaktadır. Bu gende 10'dan fazla mutasyona rastlanmakla beraber bu mutasyonların neredeyse tamamı proteinin iki çinko parmak domaininde lokalize S34 ve Q157 rezidülerinde gerçekleşir [66,67]. *U2AF1* genindeki mutasyonlar 3'splayz bölgesinin tanınmasını engeller. Farklı şekillerde splayza uğrayan ekzonların, 3'splayz bölgedeki AG dinükleotidine komşu +1 ve -3 pozisyonlarda farklı ortak nükleotidlere sahip olduğu gösterilmiştir. *U2AF1* S34F mutant protein, normal *U2AF1* ile kıyaslandığında 3' splayz bölgesinin -3 pozisyonunda sitozine kıyasla timini daha az tanır. *U2AF1* Q157 mutasyonu ise, 3'splayz bölgede +1 bölgedeki değişimlerle ilintilidir. Bu pozisyonadaki adenozin yerine guaninin tanınmasına neden olur. Son zamanlarda, Shirai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *U2AF1* S34F mutasyonu taşıyan fare modellerinde MDS özellikleri gösteren bazı bulgular saptamışlardır [60].

ZRSR2, splayzozom kompleksinin önemli bir bileşenidir ve U12 tip intronların splayzında önemli rol oynamaktadır. Bu tip intronlar, tüm intronlarının %5'ini oluşturmaktadır. ZRSR2 mutasyonlarının, MDS'li hastaların %3-11'inde görüldüğü rapor edilmiştir. Fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlardır. ZRSR2 ekspresyonu azalmış CD34+ hücrelerinde eritroid büyümesi

ve farklılaşmasının durduğu ve miyeloid hücrelerin sayısının arttığı gözlenmiştir [68]. Splayzing mutasyonları, MDS oluşumuna neden olan öncü mutasyonlardır. Geniş MDS popülasyonu ve MDS hastalarından alınan kemik iliği örneklerini analiz eden çalışmalar, splayzing ve epigenetik mekanizmasında rol alan genlerdeki mutasyonların MDS başlangıç sürecinde rol aldığını gösterirken, transkripsiyonu düzenleyen genler ve sinyal ileti yolağındaki gen mutasyonlarının hastalığın geç evrelerinde görüldüğü ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olduğu ortaya koymuştur [69].

2.4.4.2.2. MDS’de DNA Metilasyonu ve Kromatin Modifikasyonu

Geniş çaplı epigenetik çalışmalar yapılmadan önce promotor bölgedeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu aracılığı ile DNA tamir mekanizması ve tümör baskılayıcı genlerin anormal sessizleştirilmesi, MDS’de keşfedilmiştir. Bu geniş çaplı epigenetik araştırmalar, hastalığın epigenomu ile ilişkili daha kapsamlı çalışmalar yapılmasına olanak sağlamıştır. Bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar, hipermetilasyon sonucu DNA metilasyon anomalilerinin varlığını ortaya çıkarmıştır [70]. Promotor bölgedeki CpG adacıklarının metilasyonu, önemli epigenetik transkripsiyonel kontrol mekanizmasıdır ve insan tümörlerinde ve lösemilerde bu kontrol mekanizmasında aksaklıklar söz konusudur. Aynı zamanda gen ekspresyonunu etkileyen çeşitli histon modifikasyonları da yaygın görülmektedir. MDS hücrelerinde DNA metilasyon paterninde meydana gelen değişimler, sadece promotor bölgedeki CpG adacıklarını etkilemez, başta “enhancer”lar olmak üzere gen içi ve genler arası bölgeleri de etkiler. Epigenetik anomaliler, proliferasyon, adezyon ve hastalığın diğer karakteristik özelliklerini kontrol eden genlerin hipermetilasyonunu da içerecek şekilde MDS hastalarında sıklıkla gözlenmektedir [71] (Şekil 2.5).

MDS, kısmen klasik kemoterapiye, hematopoezi ilerleten, toplam sağ kalım süresini arttıran ve AML başlangıcını geciktiren 5-azasitidin ve desitabin gibi DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri ile tedaviye direnç göstermektedir. Fakat bu zamana kadar bu anormal epigenetik profilleri ve DNMT inhibitörleri ile tedaviye yanıtta çok az bir başarı elde edilmesi, bu anormal epigenetik değişimlerin MDS’nin başlangıcında mı yoksa ileri safhalarında mı olduğu sorusunu akla getirmektedir [48,72]

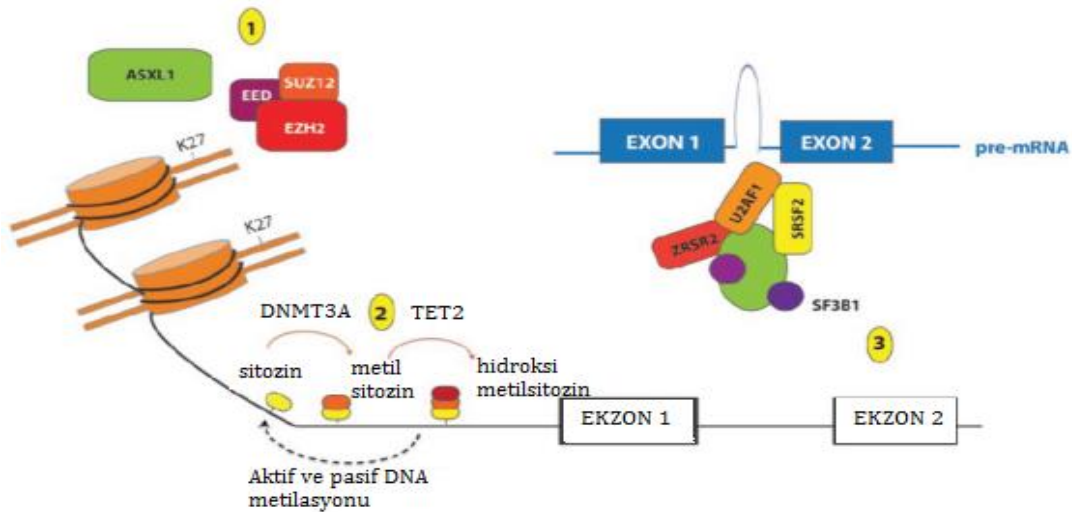
DNA metilasyonunun ve histon modifikasyonunun düzenlenmesinde görev alan birçok gen sıklıkla MDS hastalarında mutasyona uğramıştır. *Ten Eleven Translocation gene 2 (TET2)* gen mutasyonları, kromozom 4q24’te minimal bir bölgedeki tekrar eden delesyonların analizi sonucu MDS ve diğer miyeloproliferatif neoplazilerde keşfedilmiştir [73]. MDS hastalarının %20’sinde görülen bu mutasyon, KMML, AML gibi diğer miyeloid neoplazilerde de sıklıkla görülmektedir [74]. *TET2*, hematopoietik kök hücrelerin homeostazisinin kritik düzenleyicisidir

ve bu gende meydana gelen mutasyonlar, gerek normal gerekse anormal hematopoezde hematopoietik ve öncül kök hücrelerin klonal artışını ve kendini yenilemesini tetikler [56]. TET2 enzimi, DNA'da 5-metil sitozinin (5mC), 5 hidroksimetilsitozine (hmC) dönüşümünü katalizler ve böylece DNA demetilasyonuna yol açar [75]. Farelerde TET2 delesyonu, hematopoietik kök hücrelerinin sayısında artışa neden olurken granülosit ve monositlerin farklılaşmasını bloklamaktadır. TET2 eksikliği gösteren bu farelerde MDS ve KMML gibi miyeloid malignansilerin geliştiği saptanmıştır. TET2 enziminin aktivitesi *Isocitrate dehydrogenase 1* (IDH1) ve *Isocitrate dehydrogenase 2* (IDH2) enzimlerince üretilen α -ketoglutarat tarafından düzenlenmektedir [54]. IDH1 ve 2, NADP+ bağımlı enzimleridir ve izositratın α -ketoglutarat'a dönüşümünü tetiklerler. Bu genlerde özellikle bazı spesifik korunmuş rezidülerde meydana gelen mutasyonlar, substrat seçiminde değişikliğe yol açar. Bu nedenle mutant IDH1/2 enzimleri izositratı α -ketoglutarat'a dönüştürmek yerine α -ketoglutarat'ı substrat olarak kullanarak onun 2-hidroksiglutarat (2-HG)'a dönüşümünü katalizler ve böylece kofaktör olarak α -ketoglutarat'ı kullanan TET2 gibi çeşitli enzimleri inhibe ederek DNA hipermetilasyonu yoluyla hastalığın gelişimine yol açabilirler. IDH1'deki mutasyonlar ilk olarak gliomalarda keşfedilmiş ve sonrasında AML hastalarının yaklaşık %8'inde de görüldüğü saptanmıştır. MDS hastalarında ise %4-12 oranında görülmektedir. Önceki çalışmalar, IDH1 mutasyonu taşıyan kötü prognoza sahip MDS hastalarında yaşam süresinin azaldığını ve AML'ye dönüşümün arttığını rapor etmiştir. Son zamanlarda Mayo Clinic tarafından yapılan geniş çaplı bir çalışmada IDH2 140. pozisyondaki arjinin amino asitinde meydana gelen mutasyonların, yaşam süresinin kısalması ve AML gelişimi ile ilişkili olmadığı, bunun yanı sıra IDH1 ve IDH2'deki diğer mutasyonların ise klinik sonuçlar üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu rapor etmiştir. Benzer bulgular de novo AML'de de gözlemlenmiştir [70,76].

DNMT3A (DNA methyltransferase 3) geninde tekrar eden mutasyonlar, ilk olarak 2010 yılında AML'de %4-22,1 oranında gözlenmiştir [77,78]. Tanıda ileri yaş ile ilişkilendirilen bu mutasyonlar, hastalığın herhangi bir klinik, morfolojik ve sitogenetik özelliği ile ilişkilendirilmemiştir. *DNMT3A* mutasyonlarının MDS hastalarının kemik iliği hücrelerinin neredeyse tamamında bulunması, blast sayısına bakılmaksızın hastalığın gelişiminde erken bir genetik bulgu olabileceği fikrine yol açmaktadır [70].

Epigenetik düzenlenme sadece DNA metilasyon düzeyinde gerçekleşmez. Aynı zamanda asetilasyon, metilasyon ve ubiquitinasyon gibi histon proteinlerinin spesifik rezidülerinde meydana gelen birtakım post-transkripsiyonel modifikasyonlara bağlı olarak ta meydana gelir. Bu post-transkripsiyonel modifikasyonların histon proteinlerin katılımı, MDS'de mutant halde bulunan farklı spesifite özelliğine sahip bir grup histon modifiye edici enzim tarafından katalizlenmektedir. Histon kuyruklarının kovalent modifikasyonu, kromatin yapısında ve düzenleyici proteinlerin bağlanmasında değişimlere yol açar. Polycomb-represif kompleks (PRC)

proteinler, farklılaşma sürecinde gelişimsel düzenleyicilerin transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesinin önlenmesinde gerekli olan 2 farklı (PRC1 ve PRC2) protein kompleksleridir. PRC2, histon 3'te 27. pozisyonundaki lizinin trimetilasyonunda rol alırken, PRC1, histon 2A'da 119. pozisyonundaki lizinin ubiquitinasyonu kromatin yapısının değişimine yol açmaktadır [79,80]. PRC2 kompleksinin bileşenlerinden biri olan EZH2 genindeki mutasyonlar, MDS, MDS/MPN'de genellikle fonksiyon kaybı mutasyonları olarak bilinirler ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmişlerdir. MDS'li ve miyeloproliferatif neoplazili hastaların %6'sında, MDS/MPN hasta grubunda ise %12 oranında görülmektedir [81,82]. Diğer önemli bir PRC2 geni, *ASXL1* (Additional Sex Combs Like 1), hematopoietik hücrelerdeki epigenetik düzenlenmede görevli kromatin-bağlama proteini sentezler. Bu gendeki mutasyonlar, 12. ekzonda meydana gelir ve bu yanlış anlamli ve çerçeve kayması mutasyonlar *ASXL1* proteinin ekspresyonunu engeller. *ASXL1* mutasyonlarının AML'ye dönüşüm gösteren MDS ve KMML hastalarında sıklıkla gözlenmesi, hastalığın ilerlemesinde olası bir rolü olduğunu ileri sürmektedir. Bu mutasyonların, PRC2 aracılı gen ekspresyonundaki aksaklık nedeniyle miyeloid transformasyonu teşvik ettiği düşünülmektedir. Farelerde *ASXL1* genindeki delesyonun, MDS'nin karakteristik özellikleri olan çoklu sitopeni, hematopoietik kök/öncül hücre sayısında artış ile karakterize displazi ile sonuçlandığı rapor edilmiştir [83].



Şekil 2.5. MDS'de epigenetik düzenlenmeden sorumlu genleri etkileyen tekrar eden somatik mutasyonlar [70].

2.4.4.2.3.MDS'de Transkripsiyonel Faktörler

Hematopoietik farklılaşma, hücre hatlarında spesifik genlerin ekspresyonunu koordine eden transkripsiyon faktörlerinin kontrolündedir. MDS de dahil olmak üzere hem miyeloid hem de lenfoid malignansilerde transkripsiyon faktör genleri sıklıkla mutasyona uğramıştır. Bu mutasyonların, normal farklılaşmayı bozduğu ve anormal kök hücre atışına neden olduğu

düşünülmektedir. Özellikle *Runt Related Transcription Factor 1* (RUNX1) ve *ETS Variant 6* (ETV6) genleri, de novo MDS'de en sık mutasyona uğramış transkripsiyon faktör genleridir. *CEBPA* (CCAAT/enhancer binding protein alpha) geninde görülen somatic mutasyonlar AML'de sık görülürken MDS'de nadirdir. *GATA2* (GATA binding protein 2)'deki mutasyonlar ailesel MDS'ye yol açarken, somatic mutasyonlar nadirdir [84].

Kromozom 21q22'de lokalize *RUNX1* geni, transkripsiyonel core-bağlanma faktör gen ailesinin bir üyesidir. RUNX1 proteinin yüksek oranda korunmuş olan 128 a.a'lık Runt domaini, DNA'ya bağlanmada ve protein-protein etkileşimlerinde rol almaktadır. *RUNX1*, tüm hematopoietik hücre hatlarında eksprese edilmektedir ve hematopoeze spesifik çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenleyerek miyeloid hücre farklılaşmasında kilit rol oynamaktadır. RUNX1 mutasyonları, başta AML olmak üzere (%25), MDS, KMML ve nadir olarak ta MPN hastalarında görülmektedir. AML hastalarında genellikle M₀ tipinde daha sık rastlanılan bu mutasyon, MDS hastaları içinde ise sıklıkla MDS-EB alt tipinde gözlemlenmektedir. Hem AML hem de MDS hastaların RUNX1 mutasyonları iyi prognoza işaretler. RUNX1'in fare modellerindeki genetik manipülasyonu, MDS gelişiminde bu mutasyonların nasıl rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu genin ifade edilmediği farelerin embriyo halindeyken öldüğü rapor edilmiştir. Eğer yetişkinlerde bu gende mutasyon oluşur ise, ekstramedüller hematopoez, lenfoid defektler, öncül miyeloid hücre sayısında artış ve az sayıda platelet üretimi gerçekleşir ama AML gelişimi gözlenmez [51,85].

12p13'de lokalize *ETV6* geni, hematopoez ve embriyonik gelişimde kritik rol oynayan bir transkripsiyonel baskılayıcı kodlamaktadır [86,87]. Bu gen, hem lenfoid hem de miyeloid malignansilerde 30'dan fazla translokasyonun hedefindedir ve füzyon protein oluşumunda yer alır. Bu transkripsiyon faktörleri C-terminal DNA-bağlanma domainleri ile DNA'ya bağlanırlar. PNT (N-terminal pointed) domeni, SAM (sterile alpha motif) domaini, füzyon onkoproteinler ile homodimerizasyona aracılık ederek sürekli kinaz aktivitesi ve neoplastik proliferasyona neden olur [88]. Bu mutasyonu taşıyan MDS hastalarının prognozu kötüdür [89].

2.4.4.2.4.MDS'de Kohezyon kompleksleri

Kohezyon kompleks, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* ve *STAG2* olmak üzere 4 alt üiteden oluşan çok proteinli bir komplekstir [90]. Bu alt bileşenler, tüm somatik hücrelerde eksprese edilirler ve kromatin yapısının korunması, transkripsiyonel düzenlenme, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve kardeş kromatidlerin biraraya gelmesi ve segregasyonu gibi çok çeşitli hücresel süreçte görev almaktadır. Çalışmalar, bu kompleksin kromatini saran halka benzeri bir yapı oluştururken, bu alt protein bileşenlerinden hiçbirinin DNA'ya direkt bağlanma motifi içermediğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda son yıllarda yapılan çalışmalar, aktif transkripsiyonel bölgeler,

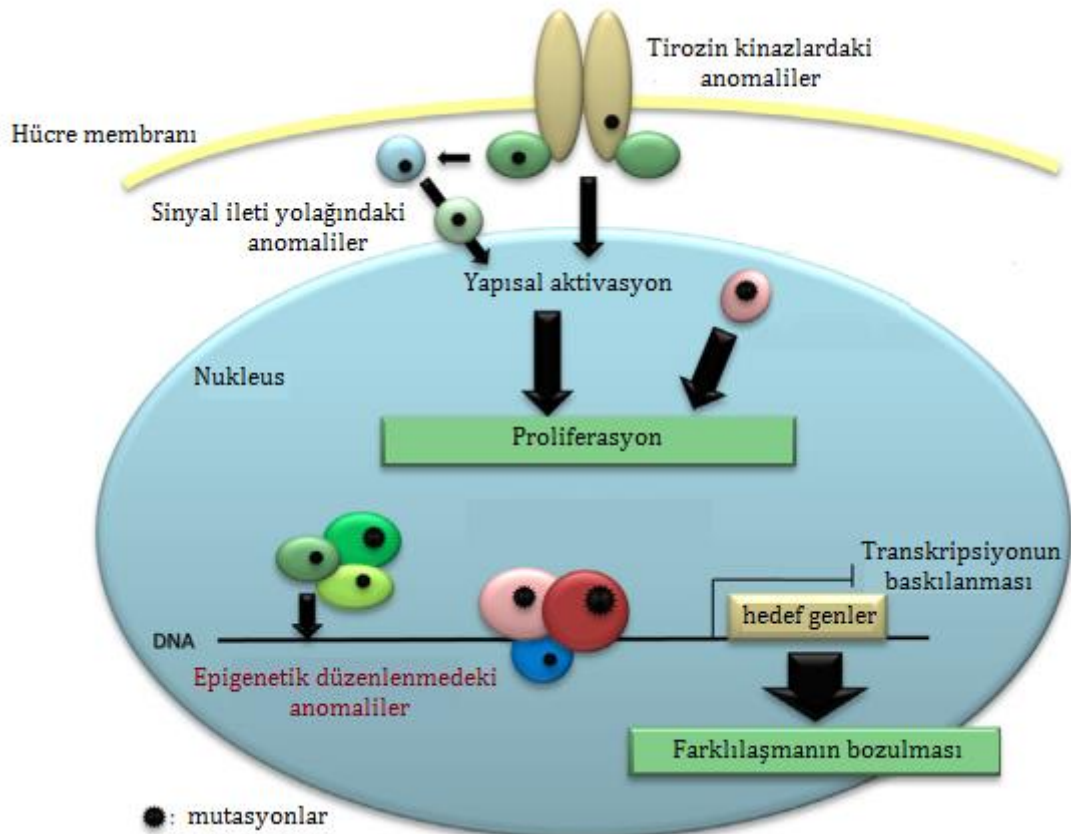
perisentrik heterokromatin, çift zincir kırıkları ve replikasyon çatalları gibi spesifik kromatin bölgelerinde çokça bulunması, kohezyon lokalizasyonunun DNA'ya spesifik düzenleyici proteinler tarafından gerçekleştiğini ileri sürmektedir [91,92]. Bu kompleks bileşenlerini kodlayan genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları, MDS hastalarının yaklaşık %15'inde gözlenmektedir. STAG2 mutasyonları %7 oranında görülürken, RAD21 veya SMC3 mutasyonlarının frekansı %1'dir. Kohezyon defektleri, STAG2 mutasyonuna sahip MDS'li hastalarda yaşam süresini kısaltmaktadır. Aksine, AML'li bireylerde bu mutasyonların yaşam sürelerini etkilemediği rapor edilmiştir [93].

2.4.4.2.5.MDS'de Sinyal İleti Yolakları

Normal hematopoez, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak, hücre içi kinaz sinyal kaskadını aktive eden sitokinler ve büyüme faktörlerine bağlı olarak düzenlenmektedir. Bu yolaktaki mutasyonlar, sürekli sinyal aktivasyonuna veya endojen uyarılara karşı aşırı duyarlılığa yol açmaktadır. Sonuç olarak bu durumdan etkilenen klonlarda aşırı proliferasyon, apoptozdan kaçma veya normal gelişim veya büyümede değişimler gözlenir (Şekil 2.6). Miyeloid malignansiler arasında, reseptörde ve sitoplazmadaki tirozin kinazlardaki bu fonksiyon kazancına yol açan mutasyonlar, AML, MPN gibi hastalıklarda yaygın bulunurken MDS'de nadirdir [84].

Ras yolağı H-,N- ve K-RAS genlerinden oluşur ve bu genler hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasında rol alırlar. N-RAS mutasyonları, yaklaşık %10 civarında görülürken, K-RAS mutasyonları ise %1-2 oranında görülür. N-RAS mutasyonları, 12, 13 veya 61. kodonda sıklıkla gözlenirken, bu gendeki mutasyonlar, yolakta yer alan diğer molekülleri hedefleyen aktif bir protein oluşumuna yol açar. Mutant N-RAS'lı MDS hastaları kötü prognozla ilişkilendirilebilir [51].

Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase (CBL), gen ürünü olan tirozin kinaz ilişkili ubikuitin ligaz, tirozin kinaz reseptörlerini degrade ederek sinyal yolağını negatif olarak düzenler. KMML ve JMML hastalarının %15'inde, MDS hastalarının ise %5'inden daha azında bu gende mutasyon saptanmıştır. CBL mutasyonları, reseptör tirozin kinaz düzeyini ve STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) proteinlerinin fosforilasyonunu arttırarak bu mutant hücrelerde çok sayıda büyüme faktörü ve sitokine karşı aşırı duyarlılığa yol açar [85]. *JAK2* (Janus kinase 2) geninde çoğunlukla 617. pozisyondaki valin-fenialanin dönüşümüne neden olan mutasyon, MDS'de nadir olarak gözlenmekle beraber Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositoz ve Miyelofibrozis gibi miyeloproliferatif hastalarda yaygındır. Bu mutasyonlar, eritropoetin, trombopoetin gibi hematopoietik büyüme faktörleri tarafından düzenlenen sinyal yolaklarının aşırı aktivasyonuna yol açmaktadır. Özellikle MDS-RS hastalarının yaklaşık %50'sinde bu gen mutasyonlarına rastlanmaktadır [84].



Şekil 2.6: MDS ile ilişkili moleküler yollar ve gen mutasyonları [56].

2.4.4.2.6.MDS'de TP53 Aktivasyon ve Mutasyonu

TP53 geni kromozom 17p'de lokalize tümör baskılayıcı bir gendir ve bu gen ürünü olan p53 proteini, çeşitli stres etkenlerince aktive olur ve hücre siklusu arresti, DNA tamir mekanizmasının tetiklenmesi ve hücreleri apoptoza yönlendirme gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. *TP53* mutasyonu, neredeyse tüm tümör tiplerinde bulunmakla beraber genomik instabilite ile ilişkilendirilmektedir. MDS'de de novo hastaların %5-15'inde bu gen mutasyona uğramıştır ve alkileyci ajanlar ve radyasyona maruz kalan hastalarda ise mutasyonun görülme frekansı artmaktadır. 17p'deki kromozomal anomaliler veya nokta mutasyonlar neticesinde yabancı tip p53 kaybı, hastalığın ilerlemesi, kompleks karyotip ve kemoterapiye direnç ile ilişkilendirilmektedir [94, 95].

Sonuç olarak, hastalığın klinik heterojenitesi, hastalığın patogenezinde rol alan çok sayıda genetik anomaliden kaynaklanmaktadır. Teknolojik gelişmeler, MDS hastalarında hastalığın patogenezi hakkında bilgi sahibi olmamıza yönelik çok sayıda yeni genetik lezyonların keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Spesifik mutasyonlar, hastalığın alt tiplerinin sınıflandırılmasında ve prognozunda önemli bilgiler sunarken, moleküler faktörler tanı kriterleri ve klinikte kullanılmaya başlanmıştır.

2.4.5. Hastalığın Prognozu

MDS hastalarının bilgilendirmesinde ve uygun tedavi seçiminde risk değerlendirmesi oldukça önemlidir. Hastalığın doğal yapısında hastaların %25-30'unda AML gelişimi söz konusu olmasına rağmen, çoğu hasta AML'ye dönüşüm göstermemekte ve kardiyovasküler hastalıklar gibi yaşlı bireylerde sık görülen durumlar veya sitopeni komplikasyonları neticesinde ölmektedir [96]. MDS hastalarının hayatta kalım ve AML'ye dönüşüm riskinin tahmin edilmesinde çeşitli klinik, patolojik ve biyolojik faktörler yer almaktadır. Bunlar; sitopeni derecesi, kemik iliği blast yüzdesi, kemik iliği sitogenetiği, serum laktat dehidrogenaz seviyesi, olgun olmayan prekürsörlerin anormal lokalizasyonu için kemik iliği histolojisi, fibröz varlığı, kemik iliği immünofenotipi ve in vitro kemik iliği kültür özellikleridir. Bu faktörlerin hiçbirisi ayrı ayrı veya birarada prognostik bir belirteç olarak değerlendirilmez. Bu durum, Greenberg ve arkadaşları tarafından 1990'lı yılların ortasında geliştirilen ve en çok kullanılan prognostik sınıflama sistemi olan uluslararası prognostik skorlama sistemi (IPSS)'nin gelişimine olanak sağlamıştır [97,98]. Blast yüzdesi, sitopeni sayısı ve kemik iliği sitogenetiği baz alınarak hastalar 4 farklı risk kategorisine ayrılmıştır [99] (**Tablo 2.3**).

Düşük Risk Grubu:

- IPSS'ye göre düşük risk
- IPSS'e göre orta-1 risk

Yüksek Risk Grubu:

- IPSS'e göre orta-2 risk
- IPSS'e göre yüksek risk

Sistem, kromozomal anomaliler baz alınarak 3 farklı gruba ayrılmıştır:

- **İyi Risk:** (Normal, izole del(5q), izole -Y ve del(20q)) hastaların %70'i bu grup içinde yer alır ve bu hastaların ortalama hayatta kalma süresi 3,8 yıldır.
- **Orta Risk:** Hastaların %14'ünü kapsar ve ortalama hayatta kalma süresi 2,4 yıldır.
- **Düşük Risk:** Kromozom 7 anomalileri veya kompleks karyotip anomalileri taşıyan MDS hastaları bu grup içerisinde yer alır. Ortalama hayatta kalma süresi 0,8 yıl ve total hastaların %16'sını içerir [100].

Tablo 2.3: Uluslararası Skorlama Sisemi

Prognostik faktör	Skor değeri				
	0	0.5	1	1,5	2
Kemik iliği (%)	<5	5-10	-	11-20	21-30
Karyotip	İyi: normal, izole -Y,izole del(5q) veya izole del(20q)	Orta: tüm karyotipler	Zayıf: Anormal kromozom 7 veya kompleks karyotip		
periferal kan sitopenileri	0 veya 1	2 veya 3	-	-	
Ortalama Yaş (y)					
Risk kategorisi	Skor	Tüm hastalar	Hastalar (<60 yaş)	Hastalar (>60 yaş)	AML gelişimi (y)
Düşük	0	5,7	11,8	4,8	9,4
Orta-1	0,5-1	3,5	5,2	2,7	3,3
Orta-2	1,5-2	1,2	1,8	1,1	1,1
Yüksek	≥ 2,5	0,4	0,3	0,5	0,2

IPSS, bazı kısıtlamalar içermektedir:

- Sadece hematopoietik büyüme faktörleri veya destekleyici bir tedavi alan de novo yetişkin bireylerin değerlendirmeye alınması
- Sitopeni derecesinin hesaba katılmaması
- Karyotip içeriğinin sınırlı olması
- Transfüzyon ihtiyacı gibi çeşitli risk faktörlerini kapsamaması

Bu kısıtlamalar dikkate alınarak 2007'den itibaren Dünya Sağlık Örgütü Skorlama Sistemi (WPSS) ve Revize Edilmiş Uluslararası Skorlama Sistemi (IPSS-R) gibi çeşitli sınıflandırma sistemleri geliştirildi. WPSS, WHO tarafından belirlenen hastalığın morfolojik özellikleri, IPSS sitogenetiği ve transfüzyon ihtiyacı gibi kriterleri içermektedir. Bu skorlama sisteminin temelini, MDS hastalarının prognozunda negatif etkiye sahip olan kan transfüzyon ihtiyacı oluşturmaktadır. Bu negatif prognostik etki, transfüzyon bağımlılığının sadece sağkalım süresini azaltmayla ilişkili olmadığı aynı zamanda AML gelişim riskinin artmasıyla da ilişkili olduğunu ortaya çıkaran Sanz ve arkadaşları (2006) tarafından doğrulanmıştır. WPSS, hastaları, çok düşük, düşük, orta, yüksek ve çok yüksek risk olmak üzere 5 alt gruba ayırır. Ortalama hayatta kalma süresi 103 aydan (çok düşük risk grubu) 12 aya (çok yüksek risk grubu) değişkenlik göstermektedir [101,102].

IPSS-R, 2012 yılında 10'dan fazla ülkeden toplamda 7000'in hastanın analizlerine bağlı olarak yayımlandı. Çok daha fazla sayıda sitogenetik anomaliyi içermesi ve sitopeni gibi diğer

değişkenlere kıyasla sitogenetik bulguların ağır basmasıyla IPSS'ten ayrılmaktadır. Ek olarak, IPSS'de 4 olan risk kategorisi, IPSS-R'de 5 olacak şekilde revize edilmiş ve sitopeni derecesi değerlendirmeye alınmıştır (Tablo 2.4). Bu gelişmelere rağmen, IPSS-R hala tanı sırasında sadece de novo MDS hastaları üzerinde geçerlidir [96].

Tablo 2.4: Revize Edilmiş Uluslararası Skorlama Sistemi

Risk grubu	Skor	Bu risk grubundaki hastalar (%)	Ortalama sağkalım (yıl)	AML gelişimi (yıl)
Çok düşük	0-1,5	19	8,8	-
Düşük	2-3	38	5,3	10,8
Orta	3,5-4,5	20	3	3,2
Yüksek	5-6	13	1,5	1,4
Çok yüksek	>6	10	0,8	0,7

2.5. Akut Miyeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi (AML), normal hematopoietik kök hücrelerdeki genetik değişimler sonucu oluşan klonal bir hematopoietik hastalıktır. Bu genetik değişimler, farklılaşmayı bloklar ve/veya blast olarak adlandırılan olgunlaşmamış lösemik hücrelerin aşırı artmasına neden olur. Hastalığın ilerleme aşamalarında blast hücreleri, kan, kemik iliği ve diğer organlarda birikir ve normal kan hücrelerinin üretimini engeller. Lösemik blastlardaki genetik değişimler, bu hücrelerin olgun kırmızı kan hücrelerini, nötrofilleri, monosit ve platelet üretiminde etkisiz hale getirir. Ek olarak, bu AML blastları, normal blastların olgun hale gelmelerini inhibe eder. AML hızlı bir şekilde ilerler ve tedavi edilmeze enfeksiyon, kanama ve organ yetmezliği nedenleriyle haftalar, aylar içerisinde hastaların kaybedilmesine neden olur [103].

2.5.1. AML'nin Tarihçesi

Lösemi ile ilgili ilk tanımlama MÖ. 400'lü yıllarda Yunan filozof Hipokrat tarafından yapılmıştır. "Tıp'ın babası" olarak adlandırılan Hipokrat tümör etrafındaki kan hücrelerini kısıp yapısına benzetmiş ve bu nedenle hastalığı Yunanca yengeç anlamına gelen "karkinos" olarak adlandırmıştır. 19. yy'ın ilk zamanlarında kanda az görülen değişimlerle ilgili bazı vakalar rapor edilmiştir. Bu vakalardan birinde Fransız hekim Alfred Velpeau, ateş, halsizlik ve karın şişliği şikayetiyle gelen 63 yaşındaki hastanın otopsisinde sonucunda karaciğerinde anormal bir büyümenin olduğunu (normalden yaklaşık 20 kat büyük) ve kanının kıvamının artmış olduğunu rapor etmiştir. Mikroskobun keşfine kadar kan hücrelerinin incelenmesi mümkün değildi. Yaklaşık 20 yıl sonra William Hewson, lenfosit ve lenfatik sistemi tanımladı [104,105]. 1845 yılına

kadar hastalık çok iyi tanımlanamamıştır. 1845'te şu anda lösemi olarak bilinen hastalık, Carigie ve Bennett ve Virchow tarafından yapılan 3 farklı otopsi sonucunda beyaz kan hücreleri ile ilişkilendirilmiş ve 1847'de Virchow hastalığı Yunanca "leukos" (beyaz) "heima" (kan) kelimelerinden türeyen lösemi olarak tanımlamıştır [106].

Henry Fuller (1850), 9 yaşındaki bir kız çocuğunda, kanın mikroskopik incelenmesiyle ilk kez çocukluk çağı lösemi vakasını rapor etti. Bir seri araştırmadan sonra Virchow (1856) hücre sel orjinleri baz alarak lösemiye lökositozdan ayırdı. 1868'te Ernts Neumann lösemideki kemik iliği değişimlerini rapor ederek kemik iliği hastalığı olarak tanımlamıştır. Tıp öğrencisi ve nobel ödüllü Paul Ehrlich tarafından 1877'de histokimyasal boyama methodlarının keşfi, lösemi alt tiplerinin ayırımına olanak sağlamıştır. 1900 yılında Otto Nageli tarafından miyeloblast ve lenfoblastların tanımı yapılmıştır. 1913 yılına gelindiğinde ise lösemi, akut veya kronik, miyeloid veya lenfoid olarak sınıflandırılmıştır [107].

2.5.2. AML'nin Epidemiyoloji

Amerika'da her yıl yaklaşık 6500 çocuk ve yetişkin bireylere Akut lösemi tanısı konmaktadır. AML, bu vakaların %15-20'lik kısmını oluşturmaktadır [108]. Akut lösemiler, tüm kanser türlerinin %3'ünden daha az bir kısmını kapsasa da çocuklarda ve 39 yaş altı bireylerde ölüme yol açmaya devam etmektedir. Batı ülkelerinde yetişkinlerde tüm lösemi türlerinin %25'i AML vakaları olup, löseminin en yaygın tipini oluşturmaktadır. Dünya geneline baktığımızda AML'nin insidansı, Amerika, Avusturya ve Batı Avrupa'da en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Amerika'da her 100.000 kişide 4.3 görülme insidansı ile 15 yaş altı çocuklarda en sık görülen kanser tipi lösemidir. Bu yaş grubu içerisinde Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), AML'den yaklaşık 5 kat daha yaygın görülmekle beraber tüm çocukluk çağı lösemi vakalarının yaklaşık %76'sını oluşturmaktadır. AML vakalarının %42,8'i 65 yaş üstü bireyli kapsamaktadır. Yeni AML tanısı konmuş bireylerin yaş ortalaması 65'tir. 40 yaş öncesi AML tanısı nadiren konmaktadır bu nedenle insidans yaşla birlikte artış göstermektedir. Örneğin 2000-2003 yılları arasında Amerika'da 65 yaş altı bireylerde hastalığın görülme insidansı her 100.000 kişide 1.8 iken, 65 yaş üstü bireylerde bu oran 17'dir. Hastalığın insidansı yaş ve ırklar arasında da değişkenlik göstermektedir. Özellikle 1-4 yaş arası çocuklarda hastalığın görülme insidansı 100.000'de 0.8'dir. Yaşamın ilk yıllarında AML insidansı siyah ırka oranla beyaz ırkta 3 kat fazla görülmekle beraber 3 yaşından büyük çocuklar arasında siyah ırkta hastalık daha fazla görülmektedir. Çoğu ülkede yetişkin bireylerde AML, az bir farkla da olsa kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülür. Amerika'da yaşa bağlı olarak her iki cinsiyette hastalığın görülme insidansı 100.00 de 3.7 olmakla beraber erkeklerde bu oran 100.000'de 4.6, kadınlarda ise 3'tür [109,110].

2.5.3. AML'nin Sınıflandırılması

Etiyolojik, morfolojik, immünofenotipik ve genetik özelliklere bağlı olarak AML için farklı sınıflandırma sistemleri kullanılmıştır. İlk defa 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından oluşturulan bu sınıflandırma sistemiyle AML, genetik lezyonların rahatça değerlendirilebileceği morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre sınıflandırılmıştır [111]. Bu sistemde AML tanısının konulabilmesi için kemik iliğindeki blast oranı %30'dan fazla olmalıdır [109]. FAB sınıflama sistemine göre AML 8 (M₀-M₇) alt tipe ayrılmaktadır (Tablo 2.5).

Tablo 2.5: AML'de FAB sınıflaması [103].

AML Alt Tipi	Tanımlama	İnsidans (%)
AML-M ₀	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi	5
AML-M ₁	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi	15
AML-M ₂	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi	25
AML-M ₃	Akut promiyelositer lösemi	10
AML-M ₄	Akut miyelomonositer lösemi	20
AML-M _{4e} os	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi	5
AML-M ₅	Akut monositik lösemi	10
AML-M ₆	Akut eritrolösemi	5
AML-M ₇	Akut megakaryoblastik lösemi	5

AML blast hücreleri ortak miyeloid prekürsörlerden köken almalarına rağmen, bu blastların AML alt tiplerinde olgunlaşma seviyeleri farklılık göstermektedir. M₀-AML; minimal düzeyde morfolojik ve sitokimyasal farklılaşma göstermektedir. Çoğunlukla yetişkin bireylerde görülmekle birlikte, AML hastalarının yaklaşık %5-10'unu kapsamaktadır. M₁ ve M₂; minimal ve orta düzeyde granülosit farklılaşmasını ifade etmektedir. Tüm yaş gruplarında görülmekle birlikte özellikle yetişkin bireylerde ve 1 yaş altı çocuklarda insidansı artmaktadır. M₂-AML tipinde görülen semptomlar M₁ alt tipiyle benzer özellikler göstermektedir. Hastaların %50'sinde lökosit sayısında azalma görülmektedir. Myeloblastlar dominant hücre tipi olabilmektedir. M₃; Akut promiyelositik lösemi (APL), genellikle genç bireylerde daha çok görülmektedir. 15 ve 17. kromozomların uzun kolları arasında meydana gelen resiprokal translokasyon sonucu oluşan füzyon gen, M₃ alt tipinin oluşumuna öncülük etmektedir. M₄; Akut miyelomonositer lösemi, lösemik monositik hücrelerin kanda, kemik iliğinde veya her ikisinde artış göstermesiyle M₁, M₂ ve M₃ alt tiplerinden farklılık göstermektedir. M_{5a} ve M_{5b}; minimal ve orta düzeyde farklılaşma gösteren akut monoblastik lösemidir. M₅ alt tipin tanı kriterlerinden biri, eritroid olmayan hücrelerin %80 veya daha fazlasının monositik hücreler olmasıdır. M₆; Akut eritroblastik lösemi,

löseminin nadir tiplerindendir ve primer olarak periferel hücreleri etkilemektedir. Klinik belirtileri AML'nin diğ r tipleriyle benzerlik göstermektedir. Lökosit ve platelet miktarında azalma görülmektedir. Tüm AML vakaların %2-7'sini oluşturmaktadır. Tüm yaş gruplarında görülmekle birlikte kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülmektedir. Özellikle 56 yaş ve üstü hastalarda görülme yüzdesi daha fazladır. Son olarak M₇ ise Akut megakaryoblastik lösemi'yi ifade etmektedir. Nadir görülmektedir. Bu sınıflandırmanın amacı, tanı koymada hastaların risk derecelerini belirlemek ve böylece uygun tedavi yöntemlerinin uygulanmasına olanak sağlamaktır [112,113].



Tablo 2.6. AML’de WHO Sınıflaması

Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML • t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile ilişkili AML • inv(16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ile AML • Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q22), (PML/RARα) ile AML • t(9;11)(q21.3;q23.3), (MLLT3-KMT2A) ile AML • t(6;9)(q23;q34.1), (DEK-NUP214) ile AML • inv(3)(q21.3;q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2) (GATA2-MECOM) ile AML • t(1;22)(p13.3;q13.3), (RBM15-MKL1) ile AML • BCR-ABL1 içeren AML • NPM1 mutasyonu içeren AML • Biallelik CEBPA mutasyonu içeren AML • RUX1 mutasyonlu AML Miyelodisplazi ile Seyreden AML Terapi İlişkili Miyeloid Neoplazmlar Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML • Minimal farklılaşma gösteren AML • Olgunlaşma göstermeyen AML • Olgunlaşma gösteren AML • Akut miyelomonositik lösemi • Akut monoblastik ve monositik lösemi • Akut eritrolösemi • Akut megakaryoblastik lösemi • Akut bazofilik lösemi • Akut panmiyeloz
--

İlk zamanlarda yeterli bir sınıflama sistemi gibi görünse de özellikle Akut promiyelositer lösemi’nin diğer alt gruplardan farklı olduğunun anlaşılması ve FAB sisteminin bu konuda yetersiz kalması nedeniyle Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO), morfoloji, immünofenotip, sitogenetik ve moleküler özellikleri temel alarak ve blastik hücre sayısını %30’dan 20’ye indirerek yeni bir sınıflandırma sistemi yapmıştır [114] (Tablo 2.6).

AML gelişimi çok basamaklı bir süreçtir. Gilliland ve Griffin’in (2002) önerdikleri çift vuruş hipotez modelinde sinyal ileti yollarını aktive eden ve hematopoietik hücrelerin proliferasyonunu arttıran sınıf 1 mutasyonlar ve transkripsiyon faktörleri ve hematopoietik

farklılaşmayı baskılayan sınıf 2 mutasyonları rol oynamaktadır. Reseptör tirozin kinaz, c-Kit ve Ras sinyal yolağını active eden mutasyonlar sınıf 1 mutasyonlarıdır. Füzyon protein oluşumuna aracılık eden t(8;21), inv(16) ve t(15 17) gibi kromozomal aberasyonlar ise sınıf 2 mutasyonları olarak adlandırılmaktadır. Sadece kromozomal anomaliler değil aynı zamanda *RUNX1*, *C/EBPα* ve *MLL* gen mutasyonları da bu gruba girmektedir. Bu mutasyonlar dışında sıklıkla genetik değişim gözlenen genler ise *DNMT*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *ASXL1*'dir ve bu genler henüz sınıflandırılmış değildir [115] (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. AML'de sık görülen mutasyonlar

Mutasyon	AML'de görülme frekansı	Fonksiyonu	Prognoz
NPM1	%30-45	Nükleolar bileşen	iyi
DNMT3A	%34	DNA metilasyonu	-
FLT3-ITD	%28-34	Reseptör tirozin kinaz	kötü
FLT3-TKD	%11-14	Reseptör tirozin kinaz	-
IDH1/2	%15-30	α -ketoglutarat dönüşümü	iyi
TET2	%10	5-metil sitozinin 5-metil hidroksisitozine dönüşümü	-
ASXL1	%5-16	Epigenetik düzenleme	kötü
CEPBA	%10-18	Transkripsiyon faktörü	iyi
RAS	%25 NRAS %15 KRAS	G-protein ilişkili reseptör tirozin kinaz	-
KIT	%20-30	Reseptör tirozin kinaz	kötü
RUNX1	%5-13	Hematopoietik transkripsiyon faktörü	kötü
TP53	%5-20	Tümör baskılayıcı gen	kötü

2.6. Mikro RNA'lar

Son yıllara kadar insan genomunun sadece %3'lük kısmının protein kodladığı ve DNA'mızın büyük kısmının kodlanmayan DNA olduğu görüşü yaygındı. Fakat bu görüş son yıllarda değişti. Özellikle 2012 yılında ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) projesi insan genomunun %75'inin transkripsiyonel olarak aktif olduğunu ve böylelikle kodlanmayan RNA'ların insan transkriptomunun bir kısmını oluşturduğunu ortaya çıkardı. Kodlanmayan RNA'lar protein kodlama özelliği olmayan fonksiyonel RNA'lardır. 1950 yılında ilk kodlanmayan RNA türleri olan ribozomal RNA ve transfer RNA'nın keşfinden sonra çok sayıda kodlanmayan RNA keşfedilmiştir. Bunlardan biri olan mikroRNA'lar yaklaşık 22 nt uzunluğunda, kodlanmayan küçük RNA'ların bir sınıfını oluşturmaktadır. 2014 yılı verilerine göre miRNA veritabanında 28,645'ten fazla miRNA bulunmaktadır [116,117]. Bu küçük RNA'lar, memelilerdeki tüm protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ının post-transkripsiyonel düzenleyicileri olarak görev yaparlar [118, 119].

2.6.1. miRNA'ların Keşfi ve Genomik Lokalizasyonu

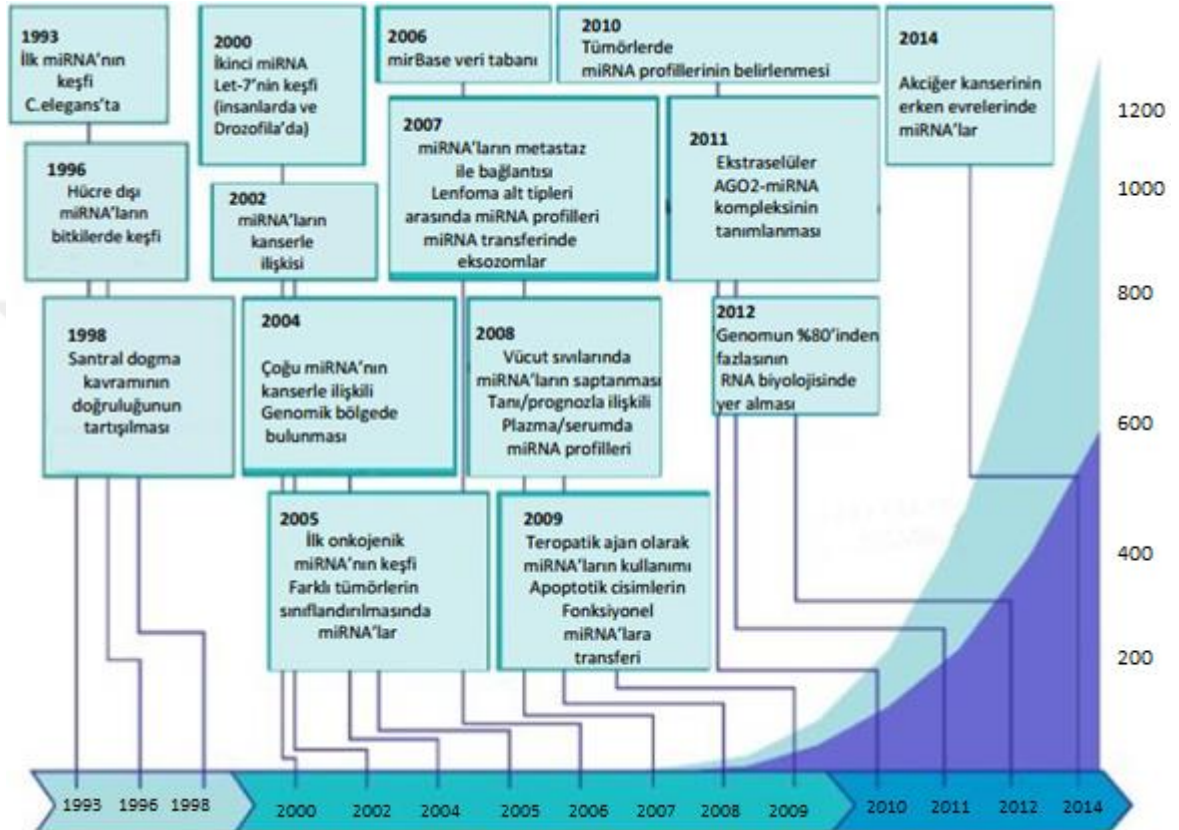
Gelişimsel ve biyolojik süreçleri çalışmak için kullanılan en iyi sistem, ilk defa Sydney Brenner tarafında 1974'te kullanılan ve bir yuvarlak solucan türü olan *C.elegans*'tır. Bu canlı türünün kullanılmasının en önemli basamaklarından biri miRNA keşfine olanak sağlamasıydı [120]. İlk miRNA olan *lin-4*, 1993 yılında Victor Ambros ve arkadaşlarının *C.elegans*'ta larval gelişimdeki bozukluklar üzerine yapmış oldukları genetik çalışmalar sonucu keşfedilmiştir [118,121]. *C.elegans*'taki heterokronik genler, tüm larval evrelerin temporal gelişimini kontrol etmektedir. Bu genlerden biri olan *lin-4*'ün izolasyonu, gendeki mutasyonların gelişim bozukluğuna yol açtığını ortaya çıkardı. 1987'de Fergunsson ve arkadaşları Hortitz's laboratuvarında yapmış oldukları çalışmada *lin-4*'ün diğer temporal gen olan *lin-14*'ü negatif olarak düzenlediğini göstermişlerdir [122].

2000 yılında ise Reinhart ve arkadaşları, yine *C.elegans* üzerinde yaptıkları çalışmada 22 nükleotid uzunluğundaki 2. miRNA'yı keşfetti. Araştırmacılar, 22 nt uzunluğundaki *lin-4* ve 21 nt uzunluğundaki *let-7*'nin mRNA'ların translayonel baskılayıcıları olduklarını rapor ettiler [118,123]. *Lin-4*'ün aksine *let-7* sekansı sineklerden insanlara kadar tüm türler arasında oldukça korunmuştur. *Let-7* RNA'sı omurgalılar, hemikordat, yumuşakçalar, halkalı solucanlar, eklembacaklılar da bulunsa da bitkiler ve tek hücreli organizmalarda yer almaz. İnsanlarda beyin, kalp, böbrek, karaciğer, soluk borusu, kalın ve ince barsak, dalak, mide ve timüs gibi çoğu organda değişik düzeylerde eksprese edilmektedir. Türler arasında korunmuş olan *let-7*'nin keşfi, küçük, kodlanmayan RNA'ların bir sınıfı olan miRNA'ların araştırılmasına öncülük etmiştir. Bu zamana kadar insan ve diğer türlerde klonlama ve diğer moleküler biyolojik tekniklerle binlerce miRNA ve miRNA genleri keşfedilmiştir ve çok sayıda çalışma yapılmıştır [121,124] (Şekil 2.7).

miRNA genleri, Y kromozomu hariç tüm kromozomlarda kümelenmiş halde veya tek başlarına bulunurlar. Bilinen miRNA'ların yaklaşık %50'si kümeler halinde bulunurlar ve polisistronik olarak transkribe edilirler. İlk etapta, miRNA genlerinin intergenik bölgelerde lokalize olduğu düşünülmekteydi. Fakat miRNA gen lokasyonlarının analizleriyle ilişkili çalışmalar, memeli miRNA'larının büyük çoğunluğunun (yaklaşık %70) tanımlanmış transkripsiyon ünitelerinde yer aldığını ortaya koymuştur [125]. Genomik lokasyonuna bağlı olarak miRNA'lar;

- Kodlanan transkripsiyon ünitelerindeki intronik miRNA'lar,
- Kodlanmayan transkripsiyon ünitelerindeki intronik miRNA'lar
- Kodlayıcı bölgedeki ekzonik miRNA'lar
- Kodlanmayan bölgedeki ekzonik miRNA'lar

olmak üzere 4 alt gruba ayrılmaktadır. Ek olarak, miRNA'ların alternatif splayzing sürecine bağlı olarak hem intron hem de ekzonik bölgelerde lokalize olduğu saptanmış ve bu miRNA'lar karma miRNA'lar olarak adlandırılmıştır. Bazı intronik miRNA'ların lokasyonu çeşitli türler arasında iyi korunmuştur. Örneğin, miR-7 hem böcek hem de memelilerde *heterojen nükleer ribonükleoprotein kompleks K* (hnRNP K) geninin intronunda bulunmaktadır [126,127].



Şekil 2.7. miRNA alanındaki önemli buluşların kronolojik sıralaması ve kanserle ilişkisi [127]. (Şeklin sağında üst üste yer alan rakamlar miRNA ile ilişkili Pubmed indeksli yayımları ifade etmektedir)

2.6.2. miRNA Biyogenezi:

2.6.2.1. Klasik miRNA Biyogenez Yolağı

miRNA biyogenezi nükleus ve sitoplazmada adım adım gerçekleşir. Olgun miRNA'lar primer miRNA (pri-miRNA) ile başlayan ve çok çeşitli kesim süreçleri sonucu oluşan kısa RNA'lardır. İlk olarak, pri-miRNA, RNaz III enzim ailesinin bir üyesi olan Drosha ve çift zincirli RNA bağlama proteini olan DGCR8 (Pasha) tarafından işlenerek 70 nükleotidlik prekürsör miRNA'ya (pre-miRNA) dönüşür. Daha sonra saç tokası yapısındaki RNA'lar, RAN-GTP bağımlı taşıyıcı protein olan eksportin 5 yardımıyla sitoplazmaya geçer. Diğer bir RNaz III enzimi olan

Dicer tarafından saç tokası yapısının uzaklaştırılmasıyla 22 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA duplesi oluşur. AGO proteinlerinin yardımıyla miRNA:miRNA duplesi hedef RNA'ların yıkımı veya translasyonunun baskılayacağı RNA-indüklü sessizleştirme kompleksi (RISC)'ne katılır. Olgun miRNA zinciri fonksiyonel RISC kompleksi içinde belirlenir [128,129]. miRNA biyogenez yolağı;

- pri-miRNA'ların Transkripsiyonu
- Mikroişlemci Kompleksi Tarafından pri-miRNA'nın İşlenmesi
- pre-miRNA'ların Sitoplazmaya Transferi
- pre-miRNA'nın Dicer Tarafından Sitoplazmik Kesimi
- RISC Kompleksinin Oluşumu

olmak üzere 5 alt başlıkta incelenebilir.

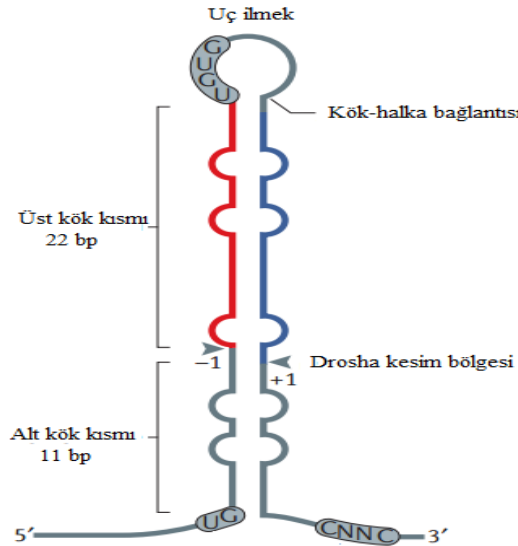
2.6.2.1.1. pri-miRNA'ların Transkripsiyonu

Transkripsiyon, miRNA biyosentezindeki majör düzenleyici basamaklardan biridir [130]. miRNA genlerinin transkripsiyonunda hangi RNA polimerazın transkripsiyondan sorumlu olduğu netlik kazanmış değildir. 2 RNA polimeraz vardır: RNA polimeraz I, proteinin kodlayan genlerin, küçük nükleolar RNA genleri ve bazı küçük nükleer RNA genlerinin transkripsiyonundan sorumludur. Diğer taraftan RNA polimeraz III ise t-RNA, 5S rRNA, bazı küçük nükleer RNA'ları da kapsayacak şekilde küçük kodlanmayan RNA'ları transkribe eder. Yapılan araştırmalar RNA polimeraz II'nin miRNA gen transkripsiyonunda daha aktif olduğunu ileri sürmektedir. İlk olarak, pri-miRNA'lar 70 nükleotidlik pre-miRNA'lardan daha uzundur ve bazen birkaç bin baz uzunluğuna sahip olabilmektedir. Örneğin, pri-miR-21, 3433 nükleotid uzunluktadır ve polimeraz III aracılı transkripsiyon için oldukça uzundur. İkinci olarak insan pri-miRNA'ları, polimeraz II gen transkriptinin temel özelliği olan 5' ucunda 7-metil guanozin başlığı ve 3' ucunda poli T kuyruğuna sahiptir [131,132]. miRNA'ların çoğu RNA polimeraz II tarafından transkribe edilse de bazı miRNA genleri polimeraz III tarafından transkribe edilir [133].

2.6.2.1.2. Mikroişlemci Kompleksi Tarafından pri-miRNA'nın İşlenmesi

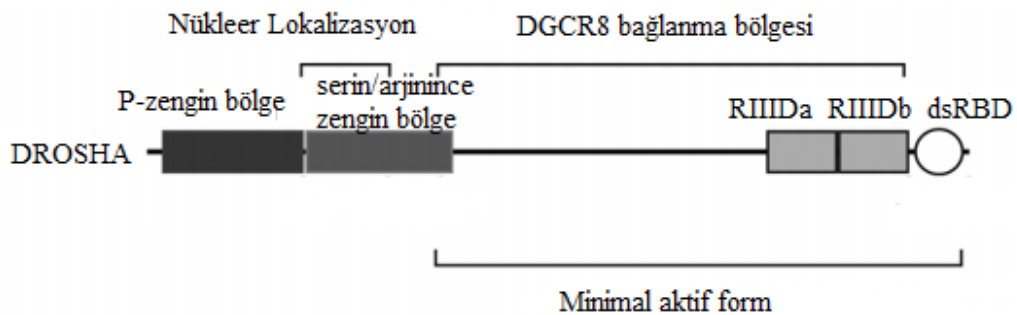
Transkripsiyonu takiben pri-miRNA, olgunlaşma sürecinde birkaç basamaktan geçer. pri-miRNA uzun (yaklaşık 1kb uzunluğunda) ve stem-loop yapısına sahiptir. Tipik bir pri-miRNA, 33-35 baz çifti uzunluğunda bir gövde, terminal bir ilmek ve 5' ve 3' ucunda tek iplikli RNA segmentinden oluşmaktadır [134] (Şekil 2.8). Son yıllarda yapılan çalışmalar, fonksiyonel miRNA oluşumunda ilave sekans ve yapısal elementlerin önemini vurgulamaktadır. Bunlar; pri-miRNA'nın apikal ucundaki UGU motifi, gövde kısmındaki GHG motifi ve bazal bölgedeki UG ve

CNNC motifidir. miRNA biyogenezindeki en önemli basamaklardan biri de bu motiflerin tanınması ve primer transkriptlerden saç tokası yapısının uzaklaştırılmasıdır [135]. pri-miRNA'nın endonükleotik yıkımı, bir Rnaz enzimi olan Drosha (RNASEN) ve DGCR8 proteinlerinin oluşturduğu nükleer mikroişlemci kompleks tarafından gerçekleştirilir [136].



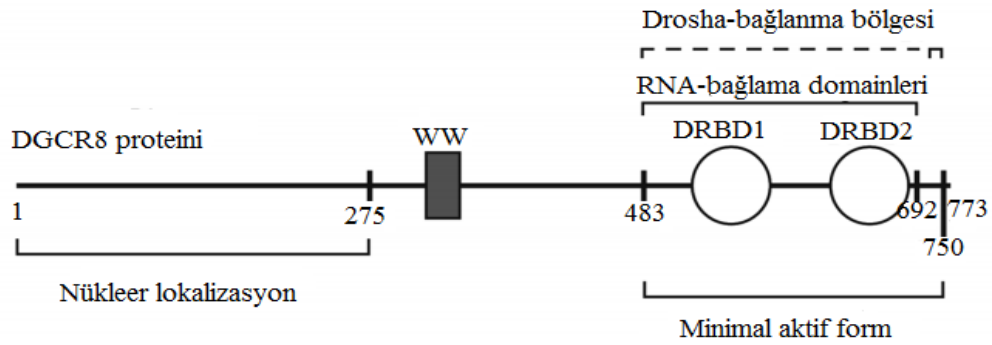
Şeki 2.8. pri-miRNA'nın yapısı [132].

Bu komplekste Drosha, kofaktörü olarak bilinen DGCR8 ile etkileşim gösterir. Gerek Drosha gerekse de DGCR8/Pasha, pri-miRNA işlenmesinde tek başına aktif değildir. Bu iki protein birlikte, pri-miRNA işlenme sürecinde kilit rol oynamaktadır [137,138]. Drosha, 130–160 kDa molekül ağırlığına sahip (insanlarda 160 kDa) birçok domainden oluşan büyük nükleer proteindir. Ardışık iki Rnaz III bölgesi ve çift zincirli RNA bağlanma bölgesi içermektedir. Amino terminal ucu proline ve serin/arjinine zengin bölgeler içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen delesyonların enzimin aktivitesini etkilemediği yapılan deneylerce kanıtlanmıştır (Şekil 2.9). Her iki domain de pri-miRNA işlenmesi için gereklidir. Rnaz II domainlerinde meydana gelen mutasyonun DGCR8'in bağlanma aktivitesini etkilemesi, bu iki proteinin etkileşiminde bu bölgelerin önemini ortaya koymaktadır [139].



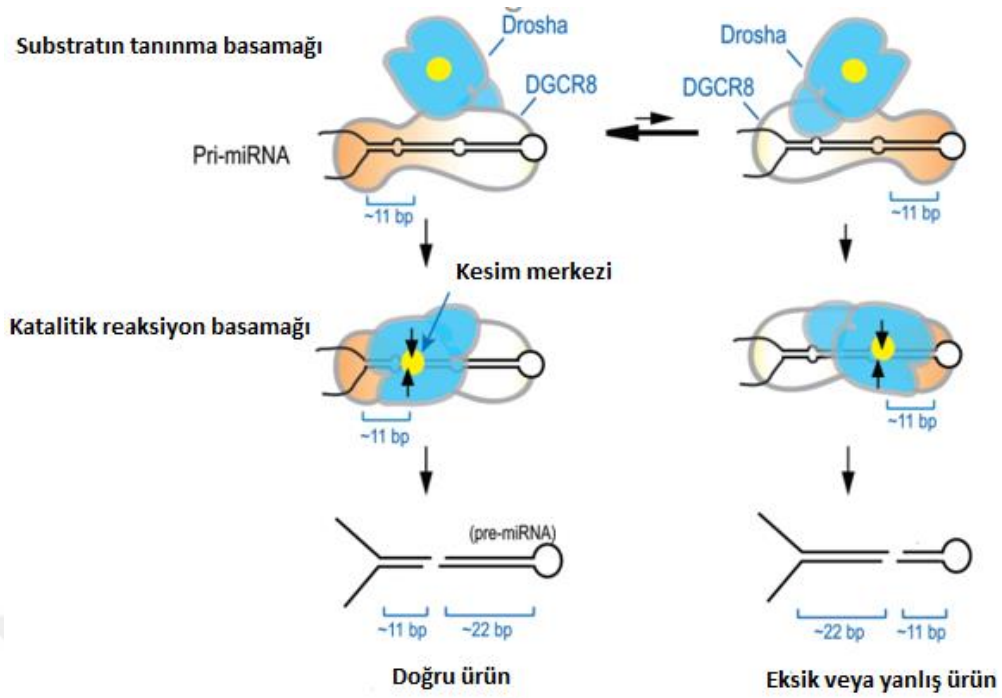
Şekil 2.9. Drosha domainleri ve miRNA biyogenezindeki görevleri [139].

DGCR8 geni insanlarda 22q11'de lokalizedir. Bu genomik bölgenin delesyonu DiGeorge Sendromu ile ilişkilendirilmiştir [140]. DGCR8, karboksil ucunda ik tane çift zincirli RNA bağlanma bölgesi ve orta kısmında WW domaini (Rsp5/wwp olarak da bilinir) içeren 120 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir (Şekil 2.10). Proteinin yaklaşık 484-750 rezidülük küçük bir kısmının pri-miRNA işlenmesini kolaylaştırmak için yeterli olduğu bulunmuştur. Bu minimal bölge hem çift zincirli RNA bağlanma domainlerini hem de karboksil uç Drosha bağlanma domainini içermektedir. Amino-terminal uç ise, işlenmede rol oynamasa da DGCR8'in nükleer lokalizasyonunda görev almaktadır. Ek olarak DGCR8, Drosha bağlanma domaini aracılığı ile Drosha proteinini stabilize etmektedir. Rnaz III proteinleri temelde benzer olsa da substrat özgünlükleri farklılık göstermektedir. Dicer herhangi bir çift zincirli RNA üzerinde etki göstererek terminal kısımdan itibaren 22 nükleotidlik fragment oluşumunu sağlar. Dicer enzimine ait PAZ domaini RNA'nın 3' ucu ile etkileşim göstererek işlem yapılacak bölgeyi belirler [141].



Şekil 2.10: İnsan DGCR8 domainleri [140].

DGCR8, pri-miRNA ile direkt etkileşime girer. Komşu tek zincirli RNA'lar bu etkileşimde önemli rol oynar ve 33 bp'lik gövde de bu etkin bağlanma için gereklidir. Bu nedenle DGCR8, çift zincir-tek zincir arasındaki ölçümü yapabilen moleküler tespit noktası olarak görev alabilir. pri-miRNA işlenme mekanizması ardışık iki basamaktan oluşur: substrat tanınması ve katalik reaksiyon basamağı. Öncelikle DGCR8, substratı bağlantı bölgesinden tanır ve yaklaşık 22bp'lik gövde kısmı ile etkileşime girer (Şekil 2.11). Drosha bu basamakta RNA ile direkt etkileşime girmeyebilir.



Şekil 2.11: pri-miRNA işlenmesinde mikroişlemci kompleksi [139].

Ön yıkım kompleksi oluştuktan sonra Drosha kısa süreliğine gövde ile etkileşime girer ve enzimin kesim merkezi bağlantı bölgesinden 11 nükleotid uzaklıkta lokalizedir. Bazı büyük terminal ilmeklerin yapısal olmayan çift zincirli RNA molekülleri olarak görülmesi nedeniyle pri-miRNA'lar çift zincirli-tek zincirli-çift zincirli olarak 3'lü sarmal yapı olarak değerlendirilir. Bu yapının oldukça simetrik olması nedeniyle, mikroişlemci kompleksi terminal ilmeği çift zincirli RNA olarak tanır ve ters yönde gövdeye bağlanır ve kesim, terminal ilmekten itibaren 11 nükleotid sonra gerçekleşir. Bu şekilde oluşan ürün eksik üründür. Çünkü miRNA sekansını tamamiyle içermez dolayısıyla doğru ürüne kıyasla etkinliği daha düşüktür [139].

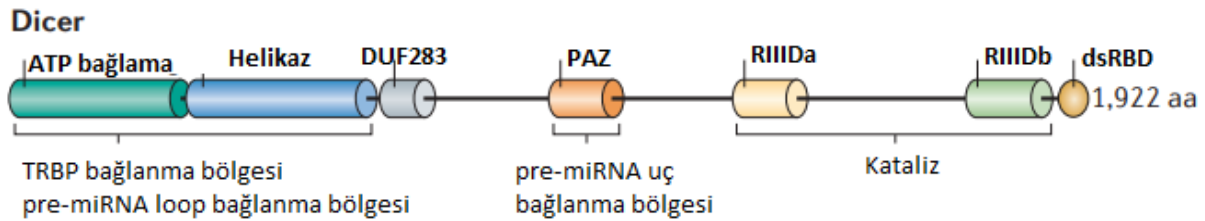
2.6.2.1.3. pre-miRNA'ların Sitoplazmaya Transferi

Nükleer por kompleksinden RNA'ların taşınmasında kargo proteindeki sinyal peptid dizisini tanıyan ve karyoferin olarak da bilinen korunmuş nükleer transport ailesine gereksinim duyulmaktadır. pre-miRNA'ların nükleustan sitoplazmaya taşınmasında karyoferin protein ailesinin bir üyesi olan Eksportin 5 (XPO5) rol oynamaktadır. Karyoferinlerin ve dolayısı ile XPO5'in bir özelliği, küçük GTPaz Ran tarafından işlevinin düzenlenmesidir. Ran, nükleusta GTP bağlı durumda, sitoplazmada ise GDP bağlı durumda bulunur. Nükleer membranda RanGTP-RanGDP gradiyentinin oluşumunda nükleusta Ran-GDP değişim faktörü olan RanGEF ve sitoplazmada Ran-GTPaz aktive eden protein olan RanGAP görev almaktadır ve nükleositoplazmik transport sürecinde itici güç oluşturmaktadır. Ran-GTP'nin amino ve

karboksil terminal uçlara bağlanmasıyla XPO5, pre-miRNA'nın çift zincir gövde bölgesinden bağlanır. XPO5, Ran-GTP ile birlikte nükleer pre-miRNA'ya bağlanır ve bu üçlü kompleks sitoplazmaya geçerek Ran-GTP hidrolize olur [142,143]. XPO5'in pre-miRNA'nın sitoplazmaya transportunu düzenlemesi nedeniyle miRNA biyogenezinde kilit basamaklardan biridir [134].

2.6.2.1.4. pre-miRNA'nın Dicer Tarafından Sitoplazmik Kesimi

Sitoplazmaya geçtiğinde pre-miRNA'lar, sitoplazmik RNaz olan Dicer ve birlikte işlev gördüğü Trans-aktivatör RNA bağlama proteini 2 (TRBP2) tarafından 22 nükleotid uzunluğunda miRNA dubleksleri şeklinde işlenirler. Dicer memelilerde 200 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir ve çoğu memeli ve bitki türlerinde, ATPaz/RNA helikaz domaini, DUF domaini, PAZ domaini (nükleik asit bağlama domaini) ve iki RNaz III domaninden oluşur (Şekil 2.12). Her bir RNaz domani çift iplikli RNA'nın tek bir zincirini keser [144]. Argonaute proteinlerinde de bulunan PAZ domaininin, pre-miRNA'nın saç tokası kısmında 3'ucundaki 2 nükleotide bağlandığı düşünülmektedir ve çift zincirli RNA-bağlama domaini ise sap kısmına bağlanır ve bazdan sonraki yıkım mesafesini tanımlar. Çift zincir Dicer ile ayrılır ve bu zincirlerden 5' ucu komplementeriyle daha az stabil olan olgun miRNA oluşumuna aracılık eder. Biyokimyasal ve yapısal çalışmalar, yüksek ökaryotlarda N-terminal helikaz domainin pre-miRNA loop yapısına bağlanmada görev aldığı ileri sürülmektedir [145]. Dicer geninde defekt olan hücreler ve farelerin yaşam ömrünün kısa olması bu proteinin gelişimde ve hücre fonksiyonlarında kilit bir rol oynadığını göstermektedir.



Şekil 2.12: Dicer domain organizasyonu [134]

Dicer, TRBP ve Argonaute protein ailesini de içeren birçok proteinle etkileşim halindedir, TRBP (TRBP2) proteini ise RNA interferans (RNAi) fonksiyonu için gereklidir; bununla birlikte TRBP proteini yıkım mekanizmasında görevli değildir, Dicer stabilizasyonunun korunmasında çeşitli fonksiyonları vardır. TRBP C terminal ve Dicer etkileşimi, RISC kompleksinin bir parçası olarak görev alması RNAi yolağının önemli bir komponenti olduğunu göstermektedir. TRBP, Dicer'in amino-terminal DexD/H-box domainine bağlanır ve Dicer yapısında konformasyonel bir değişim yaparak aktive olmasına aracılık eder. TRBP mutasyonu, kanserde gözlenmekte ve hem miRNA düzeyinde azalmaya yol açmaktadır. Dicer protein düzeyinin yabani tip TRBP ile

korunması, Dicer ve TRBP arasındaki etkileşimin Dicer stabilizasyonunda kritik belirteç olduğunu ileri sürmektedir. Dicer/TRBP yıkımı sonucu oluşan 22 nt uzunluğundaki RNA dupleksini Argounate proteinlerini harekete geçirerek RISC kompleksini oluşturur. RISC, miRNA yolağının efektör mekanizmasıdır [118,146].

2.6.2.1.5. RISC Kompleksinin Oluşumu ve Fonksiyonları

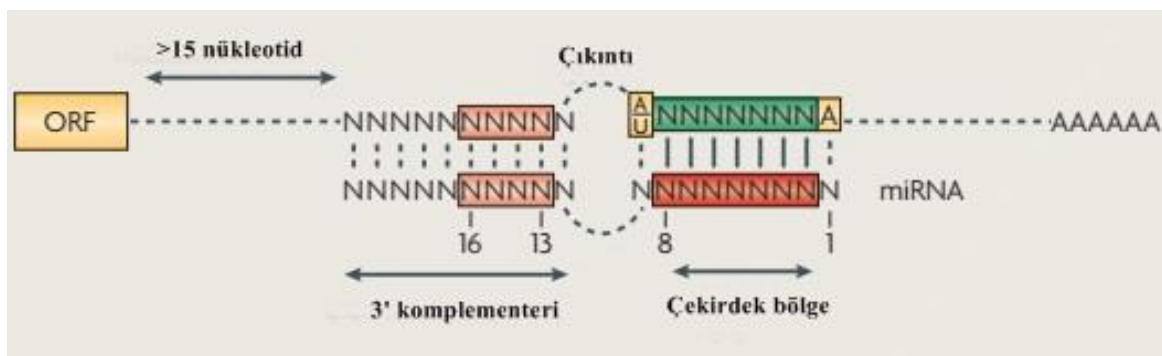
1998 yılında Fire ve arkadaşları bazı küçük çift zincirli RNA moleküllerini enjekte ettikleri *C.elegans*'ta bu moleküllerin gen fonksiyonunu baskıladıklarını keşfettiler. Sonraki zamanlarda bu küçük RNA'ların transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesinde hayli korunmuş hücresel yolakları kullandığı ortaya çıkmıştır. Post-transkripsiyonel gen sessizleştirilmesi bugünlerde ökaryotik hücrelerin gen ekspresyonunu kontrol etmede kullandığı bir nevi kendini savunma mekanizması olarak değerlendirilmektedir [147,148]. RNA aracılı gen susturma mekanizmasının kilit elemanları, sessizleştirilecek RNA'ya bağlanır ve RISC olarak bilinen efektör kompleksin oluşumuna aracılık eden Argounate protein ailesidir. Bakteri, arkea ve ökaryotlarda bulunurlar. Kilit fonksiyonları, rehber RNA'yı tanıma, hedef yıkımı ve sessizleştirmede gerekli proteinlerin bir araya gelmesini sağlamaktır [149].

RISC kompleksi, Dicer, çift zincirli RNA bağlama proteinleri (PACT ve TARBP2) ve AGO2 proteininden oluşmaktadır. İlk olarak bitkilerde tanımlanan AGO protein ailesi, tür ve organizmalar arasında yüksek oranda korunmuştur. Bu gen sayıları mayadan bir nematod olan *C.elegans*'a kadar 1-27 arasında değişkenlik göstermektedir. Memelilerde ise 8 tane AGO proteini tanımlanmıştır. AGO proteinleri çoğu organizmada eksprese edilmektedir. İnsan da AGO1, 3 ve 4 genleri, 1 nolu kromozomda lokalize iken, AGO2 ise 8. Kromozomda yer almaktadır [120,134]. Sadece AGO2'nin katalik aktiviteye sahip olduğu ve mRNA degradasyonuna yol açtığı bilinmektedir. AGO, gen sessizleştirilmesinde rehber miRNA'daki seed (çekirdek) bölgeyi kullanır. Hedefin nasıl bulunduğu yıllarca bilinmemekteydi. Son yıllarda tek molekül floresan rezonans enerji tranferi (FRET) kullanarak yapılan bir çalışma, AGO2'nin miRNA'daki 2-4 nükleotidlik kısmı baz alarak hedef bölgeleri taradığını göstermiştir. İlk olarak AGO, miRNA'daki nükleotide komplementer bölgeyi bulur ve sonra bu bölgelerle geçici bir etkileşim gerçekleşir. Eğer komplementerlik 2-4 nükleotid boyunca devam ederse bu etkileşim daha kalıcı olur. Fakat kalıcı etkileşim için 2-8 nükleotidlik minimal komplementerliğin gerekli olduğu ileri sürülmektedir. RISC kompleksi tarafından hedefin bulunmasını takiben mRNA yıkımı ve translasyonun baskılanması aracılığı ile miRNA aracılı gen sessizleştirilmesi gerçekleşir. Transkriptomik, proteomik ve ribozom profil çalışmaları, translasyonel baskılamaya oranla mRNA degradasyonunun daha çok tercih edildiğini göstermiştir [150].

Translasyonel baskılama miRNA-aracılı gen susturulması mekanizmalarından biri olmasına karşın, translasyonun başlangıç, uzama ve sonlanma basamaklarından hangisinde baskılandığı tam olarak bilinmemektedir. Bu alanda birçok grup tarafından yapılan çalışmalar, translasyonel baskılanmanın çoğunlukla başlangıç basamağında gerçekleştiğini ileri sürmektedir. Ortak görüş, miRNA'nın ökaryotik translasyon başlangıç faktör 4F kompleksinin biraraya gelmesini bloklayarak translasyonu inhibe etmesi şeklindedir [151,152].

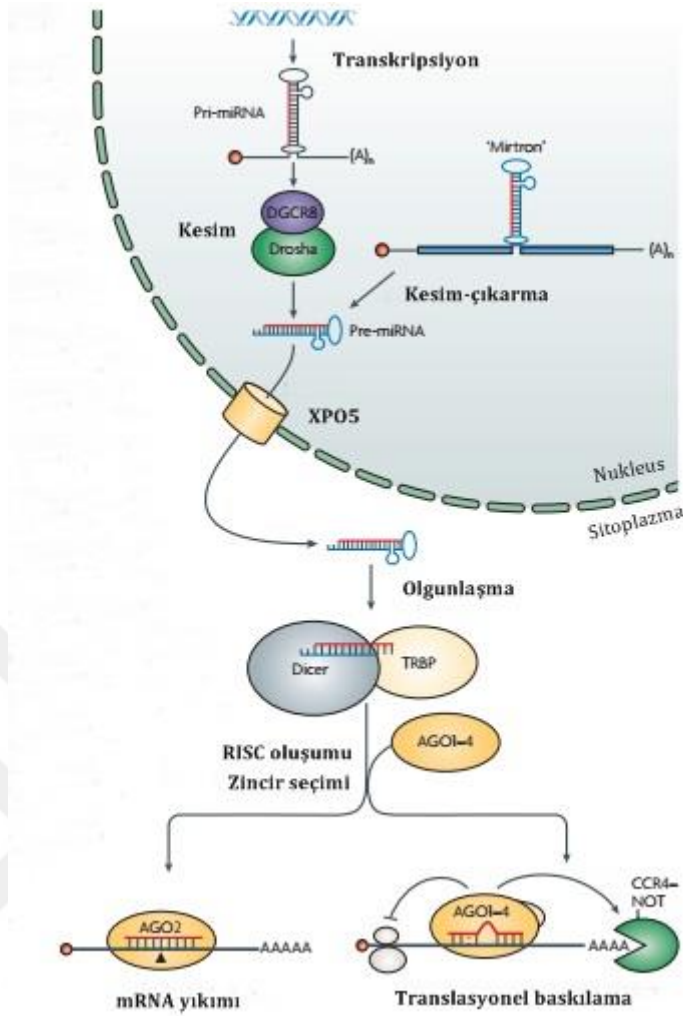
miRNA'lar baz eşleşmesi yoluyla hedef mRNA'lar ile etkileşime girerler. Bitkilerde genellikle bu eşleşme neredeyse tam komplementerlik gösterirken, RNA indüklü gen susturma mekanizması yoluyla endonükleotik mRNA yıkımı tetiklenmektedir. Nadir olarak benzer mekanizma omurgalılar ve viral miRNA'lar tarafından da kullanılmaktadır. Memelilerde ise bu eşleşmenin tam komplementerlik göstermemesi, yapılan deneysel ve biyoinformatik analizler neticesinde tanımlanmış birtakım kuralları beraberinde getirmektedir:

- 1) miRNA-hedef mRNA arasındaki baz eşleşmesi tam komplementerlik göstermese bile miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanmasını sağlayan 2-8 nükleotidlik çekirdek bölge olarak adlandırılan kısmı tam komplementerlik göstermelidir. Bu çekirdek bölgedeki GU bazları, yanlış eşleşme gösteren bazlar veya çıkıntılar büyük oranda represyonu etkiler.
- 2) AGO indüklü endonükleotik mRNA'nın yıkımını önlemek için çıkıntılar veya yanlış eşleşmeler, miRNA-mRNA dupleksinin merkez bölgesinde olmalıdır.
- 3) Etkileşimi sabitlemek için miRNA'nın 3'ucunun yarısına kadar olan kısım komplementerlik göstermelidir. Bu bölgedeki çıkıntılar ve yanlış eşleşmeler genellikle tolere edilmektedir. Çekirdek bölgedeki eşleşmenin uygun olmadığı durumlarda özellikle miRNA'nın 13-16. bazlarının tam eşleşme göstermesi önemlidir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. miRNA-mRNA etkileşimi [153].

Birkaç örnek hariç, miRNA bağlanma bölgeleri mRNA'ların 3'-UTR (3'-Untranslated Region-UTR) bölgelerinde yer alır. miRNA'lar aynı zamanda hedef mRNA'ların 5'-UTR bölgelerine bağlandıklarında da baskılayıcı özellikleri ortaya çıkmaktadır [153-155].



Şekil 2.14. Klasik ve klasik olmayan miRNA biyogenez yolağı [153].

2.6.2.2. Klasik Olmayan miRNA Biyogenez Yolağı:

Hücreler, fonksiyonel miRNA oluşturmada geniş spektrumlu mekanizmaları kullanma eğilimi gösterirler. Klasik miRNA biyogenez yolağından sapmalar sonucunda çeşitli sekanslama teknolojileri, yapısal ve fonksiyonel olarak miRNA'lara benzeyen bazı farklı RNA moleküllerini ortaya çıkarmıştır. Bu moleküller, klasik miRNA yolağında bir veya daha fazla basamağı atlayarak oluşmaktadır. Bu nedenle klasik olmayan miRNA'lar olarak ifade edilirler. Dicer, hem klasik hem de klasik olmayan miRNA biyogenez yolağının kilit elemanıdır ve Dicer yokluğunda fonksiyonel miRNA'nın oluşmadığı gözlenmiştir. Drosha ve DGCR8, sadece klasik yolda gerekli iken, klasik olmayan miRNA'lar bu moleküllerin yokluğunda oluşabilmektedir. Diğer bir ifadeyle, Drosha ve DGCR8 delesyonları, klasik miRNA oluşumunu engellerken, klasik olmayan miRNA biyogenezine etki etmezler [156].

İlk keşfedilen klasik olmayan miRNA yolağı mirtronlardır. Bu yolak, sitoplazmada Dicer enzimini kullanırken, nukleusta pre-miRNA oluşumu için Drosha/DGCR8 kompleksine ihtiyaç duymaz [116]. Mirtronlar, *Drosophila melanogaster* ve *C.elegans*'ta küçük RNA moleküllerinin sekans analizleri sonucu pre-miRNA boyutunda küçük intronların varlığı neticesinde keşfedilmiştir. Bu intronlar splaysozomlar ve enzimlerle kesilerek direkt Dicer kesimi için uygun hale gelen saç tokası yapısındaki pre-miRNA oluşturular. Bu yapı XPO5 ile nukleusa taşınarak Dicer tarafından kesim işlemi gerçekleşir. Böylelikle, mirtron yolağı mikroişlemci kompleksini pas geçerek veya tercihen splayzing aktivitesini seçerek XPO5 bağımlı transport basamağına geçer. Solucan ve sineklerde keşfedildikten sonra, bu saç tokası yapısındaki intronlar insan ve diğer memelilerde de tanımlanmıştır AGO1 ve AGO2 ile ilişkili bazı küçük nükleolar RNA'ların sekans analizleri, bu RNA'ların miRNA'ların diğer bir kaynağı olduğu ve birkaç vakada klasik miRNA yolağını izlediğini ortaya çıkarmıştır. Fakat bazı bu tip RNA'ların Drosha/DGCR8 kompleksinden bağımsız fakat Dicer bağımlı olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde bazı siRNA'ların da klasik olmayan miRNA yolağını izlediği keşfedilmiştir. Transkriptleri saç tokası yapısı oluşturma özelliğine sahip mir-320 ve mir-484 bu yolağı takip eden miRNA'lara örnektir ve endojen, kısa saç tokası RNA'lar olarak karakterize edilirler [157].

2.7. miRNA'lar ve Miyeloid Hematolojik Malignansiler

Hematopoietik kök hücrelerin kendilerini yenileme potansiyelleri ve çeşitli hematopoietik hücre hatlarına farklılaşmaları, sinyal yolakları, büyüme faktörleri, sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve diğer moleküler bileşenler gibi iç ve dış uyaranların oluşturduğu kompleks bir ağ tarafından kontrol edilmektedir. miRNA'ların bu faktörlerin birçoğunu hedef aldığı ve hematopoietik kök hücrelerin kaderini, farklılaşma durumunu, fonksiyonunu, kendini yenileme potansiyeli, apoptoz düzeyi ve aynı zamanda miyeloid ve lenfoid öncü hücreleri arasındaki dengeyi belirleyebilmektedir [158].

miRNA'ların kan kanserlerindeki önemi, büyük çoğunluğunun kanserle ilişkili genomik bölgelerde ve fragil bölgelerde lokalize olduklarının keşfiyle gösterilmiştir [159]. Kromozom 13q14 bölgesinde lokalize miRNA genlerince kodlanan miR-15a ve miR-16-1, bu miRNA'lara ilk örneklerdir. Bu miRNA'ların Kronik lenfositik lösemi (KLL), Multiple Myelom ve prostat kanseri gibi diğer kanserlerde de delete veya down-regüle olduğu gözlenmiştir [160,161]. MPP hücrelerinin CMP hücrelerine farklılaşması miR-128a ve miR-181a olmak üzere iki miRNA tarafından kontrol edilir. miR-146 lenfoid farklılaşmasını bloklarken, miR-155, -24a ve -17 miyeloid farklılaşmasını erken dönemde baskılamaktadır. Miyelopoezde kilit miRNA, CD34+ MPP ve CMP hücrelerinde düşük düzeyde eksprese edilen, granülosit farklılaşması ve olgunlaşmasında rol almaktadır.

Hematopoezde görevli miR-130a, miR- 10a, miR-181, miR-451 ve miR-155 gibi bazı miRNA'ların AML'de deregüle olduğu gözlenmiştir. Düşük düzeyde let-7b ve let-7c'nin AML'nin farklı alt tiplerinde belirlendiği ve bu ekspresyon düzeyinin değişimi *KRAS*, *TRIM71*, *nRAS*, *MYC* ve *HMGA2* gibi kanser süreçlerinde görevli genleri hedef almalarından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. miR-10a, miR-10b ve miR-29 ailesi NPM1 mutasyonlu AML hastalarında yüksek oranda eksprese edilmektedir [162]. miR-17-92 gen ailesi de MLL füzyon protein oluşumu gözlenen AML hastalarında yüksek oranda eksprese edilmektedir ve ekspresyonunun lösemik hücrelerin kendini yenileme kapasitesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ek olarak, bu gen ailesinin inhibisyonu, hem normal öncü hem de AML hücrelerinde monosit/makrofaj farklılaşması ile ilişkilendirilmiştir [163].

miRNA'ların AML'deki rolünü anlamada önemli gelişmeler kaydedilirken, aksine MDS'deki rolleri hakkında daha az bilgi mevcuttur. miRNA'ların MDS patogeneziindeki rolünü belirlemede global gen ekspresyon çalışmalarından ziyade hipotez kökenli analizler yapılmıştır. Buna rağmen, mikroarray bağımlı platformlar kullanılarak bazı makaleler ve konferans bildirileri MDS hastalarında anormal miRNA ekspresyonları tanımlamıştır [164]. 2011'de Soko ve arkadaşları, MDS'li hastalarla yaptıkları çalışmada, 44 hastanın 32'sini orta veya düşük riskli olarak sınıflandırmış ve bu hastaların (21/32) çoğunun normal karyotipe sahip olduğu göstermiştir. Mikroarray yöntemiyle 17 kontrol ve 44 hasta bireyin ekspresyon düzeyi incelenmiş ve 13 miRNA'nın hasta ve kontrol grubu arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Özellikle, miR-222, miR-10a düzeylerinin yüksek, miR-146a, miR-150 ve let-7e düzeylerinin ise düşük olduğu rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada 52 MDS, 11 sekonder AML ve 20 kontrol bireyinden alınan kemik iliği örneklerinden miR-221, miR-222, miR-150 ve miR-155 ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiş ve miR-150 ekspresyonunun kontrole kıyasla 5q sendromlu bireylerde arttığı gözlenmiştir [27,165].

miRNA'ların hematopoezdeki kilit rollerinin olması, hematolojik malignansilerin gelişiminde ve patogeneziinde rol oynayabilecekleri fikrini akla getirmektedir. miRNA biyogenez yolağında rol alan genlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişimler direkt miRNA ekspresyonunu etkileyerek malignensi oluşumuna aracılık edebilir. miRNA biyogenezinin bozulmasına neden olan diğer bir mekanizma ise miRNA olgunlaşmasında rol alan genlerde meydana gelen mutasyonel olaylardır. Hücre transkriptomunun düzenlenmesinde geniş etkileri olmaları nedeniyle deregülasyonları hücrel transformasyona neden olmaktadır [142,166].

Bu bilgilerden yola çıkarak, hematopoezin potansiyel düzenleyicileri olan miRNA'ların biyogenezinde görev alan Droscha, DGCR8, Dicer, XPO5, AGO1-2 ve TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeyleri ile kompleks ve heterojen özellik gösteren MDS ve AML arasındaki olası ilişki çalışmamızın amacını oluşturmaktadır. Bu genlerdeki ekspresyon değişimlerinin anlamlı olması

doğrultusunda, yüksek morbidite ve mortilite özelliği gösteren miyeloid hematolojik malignansiler için etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebileceği kanısındayız.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Mersin üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen 2015-TP3-1205 Numaralı "Miyeloid Hematolojik Malignansilerde miRNA Oluşum Yolağındaki Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması" isimli tez çalışmasında, T.C. Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş olup 09.07.2015 karar tarihli ve 2015/227 sayılı kararla uygun bulunmuştur.

Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na 2015-2018 yılları arasında başvuran 34 Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve 20 Akut Miyeloid Lösemi (AML) tanısı almış toplam 54 hasta ve 7 sağlıklı birey dahil edildi. Hem kontrol hem de hasta grubunu oluşturan bireylere çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair etik kurulda belirtilen yönergelerle uygun olarak hazırlanmış bilgilendirilmiş onam formu okutulup imzalatıldı. Hasta ve sağlıklı bireylerden RNA izolasyonu için 3-4 ml'lik kemik iliği örneği klinik tarafından EDTA'lı (etilendimetiltetraasetik asit) tüplere alındı. Hasta grubundaki örneklerinin temini, rutin tanı ve takip sırasında gerçekleştirilen kemik iliği aspirasyon sıvısının bir kısmının çalışma için ayrılmasıyla gerçekleştirildi. Kontrol grubunu ise; kardiyovasküler cerrahi ameliyatlarından önce göğüs kafesinin açılması için kesilen sternumdan sızan ve aspire edilerek cerrahi alandan uzaklaştırılan, hastaya ait herhangi bir tanı, tedavi ya da cerrahi işlemde kullanılmayan atık kemik iliğinin toplanmasıyla elde edilen örnekler (n=7) oluşturdu.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (Hotpoint Ariston)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Hassas Terazı (ACJ 120-4M, Kern)
- Mikropipet Seti (Thermo Electron Corporation)
- Otoklav (OT 40 L, Nüve StreamArt)
- PCR (Veriti, Applied Biosystems)
- Real-Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystems)
- Santrifüj (NF-400, Nüve)
- Vorteks (VELP Scientifica) Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (NF-048, Nüve)

- Nanodrop ((Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)

3.2.2. Sarf ve Kimyasal Malzemeler

- 5 X Hot Firepol® Probe QPCR Mix Plus (ROX) (08-14-00020, Solis Biodyne)
- 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR
- dNTPs Mix 10mM (100 ul) (SNP010-10, SNP Biyoteknoloji)
- Etanol (1009712500, Merck Millipore Corporation)
- İzopropanol (I9516, Sigma)
- Kloroform:İzoamilalkol (24:1) (X205, Amresco)
- Microamp Real Time PCR Plate kaplama Filmi (100'lük) (Applied Biosystems)
- Microamp Real Time PCR Plate tutucu (Applied Biosystem)
- Mikrosantrifüj tüpü 1,5 ml'lik (Axygen)
- PCR tüpü 0,2 ml'lik (Axygen)
- Pipet ucu 0,5-10 µl'lik (T-300, Axygen)
- Pipet ucu 1-200 µl'lik (T-200-Y, Axygen)
- Pipet ucu 1-1000 µl'lik (T-1000-B, Axygen)
- Polipropilen Real Time PCR Plate (96'lık) (Applied Biosystems)
- RevertAid Reverse Transcriptase, 5x Reaksiyon tamponu RT-PCR ile birlikte (200U/µl) (EP0442, Thermo Scientific)
- Ribolock RNase Inhibitor (40 U/µl)(EO0382, Thermo Scientific)
- Ribozol (N580, Amresco)
- Steril Distile Su (Polifarma)
- ABI RNA (Foster City, CA, USA)

3.3. Kemik İliğinden RNA eldesi

Kemik iliğinden total RNA eldesi için geleneksel guanidyum isotiyosiyonat/fenol kloroform izolasyon yöntemi kullanıldı:

1. 200 µl EDTA'lı kemik iliği örneği 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 500 µl ribozol eklenip vortekslenerek 15 dk buz içerisinde inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrası örnekler üzerine +4°C'de muhafaza edilen 200 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve hemen vortekslendi.
3. Mikrosantrifüj tüpleri +4°C'de 14.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
4. Örnekler santrifüj sonrası üstte açık sıvı fazda RNA, orta kısımda beyaz bulutumsu fazda DNA ve alttaki kırmızı fenol fazda protein olmak üzere üç faza ayrıldı.
5. RNA'nın bulunduğu üstteki faz, pipet yardımıyla alınarak etiketli tüplere transfer edildi.

6. Üzerine 500 µl hacimde izopropanol eklendi ve RNA'yı çöktürmek için 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Tüpler +4°C'de 10 dk 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
8. Süpernatant, pelletin altüst olmamasına dikkat edilerek pipetle atıldı.
9. Pellet üzerine 1 ml hacimde %80'lik soğuk etanol ilave edilerek RNA'nın yıkanması sağlandı. Sonrasında, tüpler +4°C'de 10 dk. 14.000 rpm'de santrifüj edildi.
10. Süpernatant atıldı ve etanolün kalmamasına dikkat edilerek kuruma için 10-15 dk inkübe edildi.
11. RNA pelletinin çözünmesi için üzerine 50 µl distile su ilave edildi. 15 sn kadar vorteks yapıldı ve oda sıcaklığında 10 dk. bekletildikten sonra tüpler -20°C'de saklandı.

3.4. RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi ve cDNA sentezinde kullanılacak RNA kalıp miktarlarının belirlenmesi

RNA örneklerinin optik dansite ölçümleri (saflık ve miktar tayini) Nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) kullanılarak yapıldı. Örneklerin A260/A280 oranlarının 1.7-2 arasında olmasına dikkat edildi.

cDNA sentezinde kalıp olarak kullanılacak RNA miktarları, her bir örnek için, toplam 50µl'lik reaksiyon volumü içinde 2µg/µl olacak şekilde hesaplandı ve reaksiyon karışımına eklendi. Bu yolla, bütün örnekler için eşit miktarlarda RNA'nın kullanılması ile cDNA sentezlenmesi ve örneklerdeki gen ekspresyon farklılıkların kalıp RNA miktarlarındaki değişkenlikten kaynaklanmaması sağlandı.

3.5. cDNA Sentezi

Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi, her bir örnekten elde edilen 2µg/µl RNA kalıp, Reverse Tanskiptaz ve poli T primerleri kullanılarak manuel olarak yapıldı. Reaksiyon karışımları ve koşulları aşağıdaki gibidir:

1-Tablo 3.1'deki miktarlar baz alınarak 2000 µl'lik reaksiyon tüpünde 1. karışım hazırlandı ve 10 dk -20°C'de bekletildi.

Tablo 3.1. cDNA reaksiyonu için 1. karışım

	Her bir hasta ve kontrol için eklenecek miktar (µl)	Tüm hasta ve kontroller için eklenecek miktar (µl)
5XBuffer (Tampon)	8 µl	8x örnek sayısı
dNTP, 2mM	20 µl	20x örnek sayısı
RNaz İnhibitör 40 U/µl	0,5 µl	0,5x örnek sayısı
Revers transkriptaz 200 U/ µl	0,2 µl	0,2x örnek sayısı
Toplam	28.7 µl	28,7x örnek sayısı

2-Tablo 3.2'deki miktarlara göre total hacim 21.3 µl olacak şekilde her bir hasta ve kontrol için 500 µl'lik reaksiyon tüplerine konuldu ve 5 dk kadar 90°C'de etüvde bekletildi.

Tablo 3.2. cDNA reaksiyonu için 2. karışım

	Her bir hasta ve kontrol için eklenecek miktar (µl)	Tüm hasta ve kontroller için eklenecek miktar (µl)
Primer (poli T)	5 µl	5x örnek sayısı
dH ₂ O	16,3 - Kalıp RNA	16,3 - Kalıp RNAx örnek sayısı
Kalıp RNA	Değişken	Kalıp RNA x örnek sayısı
Toplam	21,3 µl	21,3x örnek sayısı

3-2000 µl'lik reaksiyon tüpünde hazırlanan karışım, içerisinde primer, su ve kalıp RNA bulunan tüplere eşit miktarda (28,7 µl) dağıtıldı ve her bir reaksiyon tüpünde son hacim 50 µl oldu.

4-cDNA reaksiyon tüpleri, 37°C'de 60 dk, 95°C'de 5 dk olacak şekilde thermal cycler cihazında inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Örnekler, Real-time PCR uygulamasına kadar - 20°C'de bekletildi.

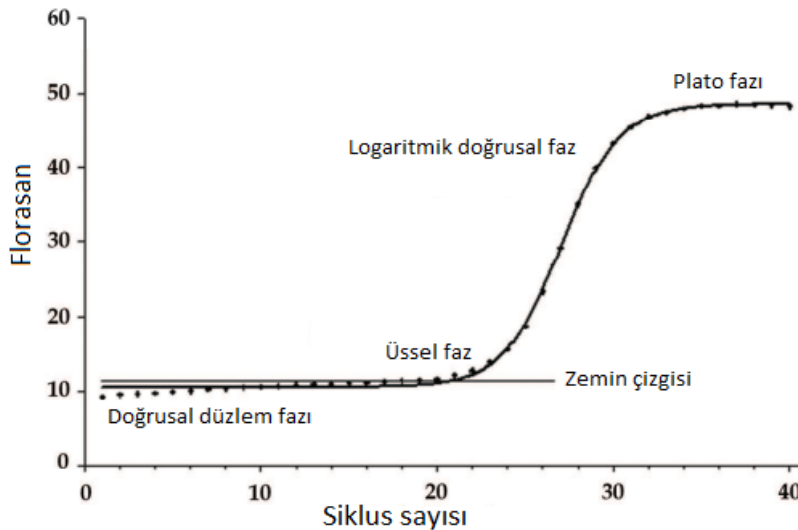
3.6. Real-Time PCR ile Ekspresyon Analizi

Real-time PCR, gen ekspresyon ölçümünde kullanılan altın standart bir yöntemdir. Bu yöntem öncesinde mRNA'nın ters transkripsiyon ile komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi gerekir. Bu basamak, hassas ve doğru miktar ölçümü açısından kritik bir basamaktır. Real-time PCR yöntemi, mRNA ekspresyonunu ölçmesinin yanı sıra, verimliliği, doğruluğu ve yüksek dinamiği nedeniyle de tercih edilen bir yöntemdir.

Real-time-PCR, dört aşamada gerçekleşebilir:

- ✓ Doğrusal düzlem fazı (linear ground phase)
- ✓ Üssel faz (exponential phase)
- ✓ Logaritmik doğrusal faz (log-linear phase)
- ✓ Plato fazı (plateau phase)

Doğrusal düzlem fazında genellikle ilk 10-15 döngüde her bir döngüde florasın emilimi zemin çizgisinin üzerine çıkacak ölçüde değildir. Böylece zemin florasın düzeyinin altında kalır. Üssel fazda, florasın miktarı zemin çizgisindeki florasın boyadan daha güçlü olarak saptanabileceği eşik değerine ulaşır. Amplifikasyonun başladığı döngü (eğrinin zemin çizgisinden yükselmeye başladığı döngü) eşik döngüsü (Ct) olarak adlandırılır ve örnekteki hedef gen miktarının belirlenmesi açısından Real-time-PCR için çok önemli bir noktadır. Logaritmik doğrusal fazda, her döngüde florasın miktarının artışı gözlenir ve eğri yükselmeye devam eder. Son faz olan plato fazında ise reaktantların tükenmesiyle amplifikasyon durma noktasına gelir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Real-time-PCR'in dört fazı [167].

Florasın prob teknolojisinin gelişimi, Real-time-PCR'in daha hassas ve spesifik olmasına olanak sağlamıştır. Reaksiyonlarda, farklı moleküler yapısı ve boya bağlantıları olan 3 tip prob

(Hibridizasyon problemleri, hidroliz problemleri ve saç tokası problemleri) vardır. Florasan boya kullanan tüm yöntemler, iki komşu boya arasındaki ışık enerjisinin transferi olarak adlandırılan florasan rezonans enerji transferi (FRET) olarak adlandırılan bir prosesi baz alır. FRET, hidroliz problemlerinde florasan yoğunluğunu azaltırken, hibridizasyon problemlerinde bu yoğunluğu artırır [167,168].

3.6.1. Primer ve Prob Dizaynı

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Enstitüsü (NCBI; National Institute of Biotechnology Information) veri tabanından, ekspresyonları analiz edilmek istenen Dicer1, Drosha, AGO1, AGO2, XPO5, TARBP2, DGCR8 ve endojen kontrol olarak kullanılan ACTB'nin RNA dizileri belirlendi. miRNA oluşum yolağında görevli genlere bu genlere ait primer prob dizileri, Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) programı kullanılarak Prof. Dr. Mehmet Emin ERDAL tarafından dizayn edildi. Her prob 5' ucunda FAM ile işaretlenmiş floresan ışığa yapabilen boya ve 3' ucunda ise bu ışımının gerçekleştiği dalga boyuna sahip ışığın yayılmasını engelleyen Black Hole Quencher™ (BHQ) adındaki “*quencher*” (soğurucu) kovalent bağ ile bağlanmıştır. Ayrıca sitozin nükleotid yerine sitozin analogu olan C-5 propinil-deoksiribo Sitozin (pdC) ilavesiyle prob tasarlanması sırasında floresan boya ile işaretli oligonükleotidin erime sıcaklığı (T_m) artırılarak hedefe özgüllük korunmaya çalışılmıştır. Prob dizileri tasarlanırken ilgili genlerin özgün olarak elde edilmesi ve ekspresyonunun ölçülebilmesi için sıkıştırılmış nükleik asit teknolojilerinden (*Zip nucleic acids-ZNA*) yararlanılmıştır (Tablo 3.3). ZNA problemler, oligonükleotidler ile yapısındaki spermin ünitesi aracılığıyla bağlantı kurar ve hedefe ilgileri artırılır. Böylece ZNA'ların erime ısı (T_m - *Melting Temperature*) önemli derecede artar ve hedefe özgüllük de artırılmış olur.

Tablo 3.3. miRNA biyogenez yolağında görevli genlere ait primer-prob dizileri

Gen adı	*Gen No	**miRNA Nükleotit Dizi No	Primer prob dizileri
AGO1	26523	NM_012199.4	F 5'-CAGCGACCACGGCAAGA-3'
			R 5'-AAACGGGTGGACTTGTAGAATTG-3'
			PR 5'-FAM-CTA(pdC)ATGGTG(pdC)GTGAGC-ZNA4-BHQ-1-3'
AGO2	27161	NM_012154.4	F 5'-GCACGGAAGTCCATCTGAAGTC-3'
			R 5'-CCGGCGTCTCTCGAGATCT-3'
			PR 5'-FAM-TT(pdC)A(pdC)AGAG(pdC)AGCTCAG-ZNA4-BHQ-1-3'
DROSHA	29102	NM_013235.4	F 5'-GAACAGTTCAACCCCGATGTG-3'
			R 5'-CTCAACTGTGCAGGGCGTATC-3'
			PR 5'-FAM-TTA(pdC)TTTT(pdC)CGATTAT(pdC)GTC-ZNA4-BHQ-1-3'
DGCR8	54487	NM_022720.6	F 5'-TCTTTGAATGTGAGAACCCAAGTG-3'
			R 5'-CCGTAAGTCACACCATCAATGG-3'
			PR 5'-FAM-CCTTTTGGTGCCTCGGT-ZNA4-BHQ-1-3'
DICER	23405	NM_001195573.1	F 5'-CCCGGCTGAGAGAACTTACG-3'
			R 5'-TGTAACCTTCGACCAACACCTTTAAAT-3'
			PR 5'-FAM-CGGGAAGGT(pdC)AGAGT(pdC)A-ZNA4-BHQ-1-3'
TARBP2	6895	NM_134323.1	F 5'-GAAGGCAGCCAAGCACAAG-3'
			R 5'-CTCCCCCTTTGAGGTGTTT-3'
			PR 5'-FAM-CAGCTGAGGTGGCCCTC-ZNA4-BHQ-1-3'
XPO5	57510	NM_020750.2	F 5'- TTGGGAGCCGCTGAGTGT-3'-3'
			R 5'-GCTTCCGGTCTTCCAATTG-3'
			PR 5'-FAM-TCT(pdC)ATTG(pdC)AGTCAGCAGA-ZNA4-BHQ-1-3'
*www.ncbi.nlm.nih.gov/gene, **www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore, kısaltmalar: F: Forward, R: Reverse, PR: Prob			

3.6.2. Real time kantitatif PCR ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi (qPCR)

qPCR işlemleri, ABI Prism 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Tablo 3.4'e göre her gen için ayrı ayrı karışım hazırlandı.

Tablo 3.4. Real-time-PCR gen ekspresyonu için kullanılan solüsyon ve miktarları

Real-time-PCR için kullanılan solüsyonlar	Her bir kuyucuğa eklenecek miktar
Mastermix	12,5 µl
dH ₂ O	5 µl
DGCR8 DROSHA DICER AGO1 AGO2 XPO5 TARBP2 B-aktin	2,5 µl (primer çifti) 0,6 (prob)
Toplam miktar	28,4 µl

Endojen kontrol olarak β-aktin kullanıldı. 96 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna 20 µl'lik karışım eklendi. Her bir gen için 5 µl cDNA örneği kondu ve plate'in üst kısmı film (MicroAmp Optical Adhesive Film) ile kaplandı. Daha sonra plate perfect spin ile santrifüj yapıldıktan sonra cihaz içindeki ısı bloğuna yerleştirildi. Başlama evresinde 50°C'de 2 dk, 95°C'de 10 dk ve döngü evresinde 50 döngü 95°C'de 15 sn, 60°C'de 90 sn olacak şekilde Real-time PCR işlemi gerçekleştirildi.

3.6.3. qPCR Verilerinin Analizi

mRNA gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesinde miktar ölçüm yolu oldukça önemlidir. mRNA transkriptlerinin miktarı, mutlak (Absolute) veya göreceli (Relative) kantitatif Real-time-PCR ile tayin edilir. Mutlak kantifikasyon, örnekteki hedef gen sekansının kopya sayısını doğru şekilde ölçmede kullanılan bir analiz yöntemi iken, göreceli kantifikasyon ise kontrol ve hasta arasında hedef sekansının miktar oranları gibi mRNA ekspresyonundaki göreceli değişimleri belirler. Böylelikle, göreceli kantifikasyon, temelde kontrol ve hasta arasındaki kat değişimlerinin

(gen ekspresyon değişimleri) belirlenmesine olanak sağlar. Genel olarak her iki yöntem de kullanılmasına rağmen, daha az sürede hazırlanması ve daha kolay kullanımı açısından göreceli kantifikasyon yöntemi daha çok tercih edilmektedir. Tercih edilme nedenlerinden biri de mutlak kantifikasyonda olan ölçüm eğrisine (standart curve) gerek duyulmamasıdır. Real-time-PCR ile gen ekspresyon tayininde hedef gen için hem kontrol hem de hasta örnekleri uygun bir housekeeping veya referans gen ile normalize edilir. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi, olarak adlandırılan bu yöntemin formülasyonu:

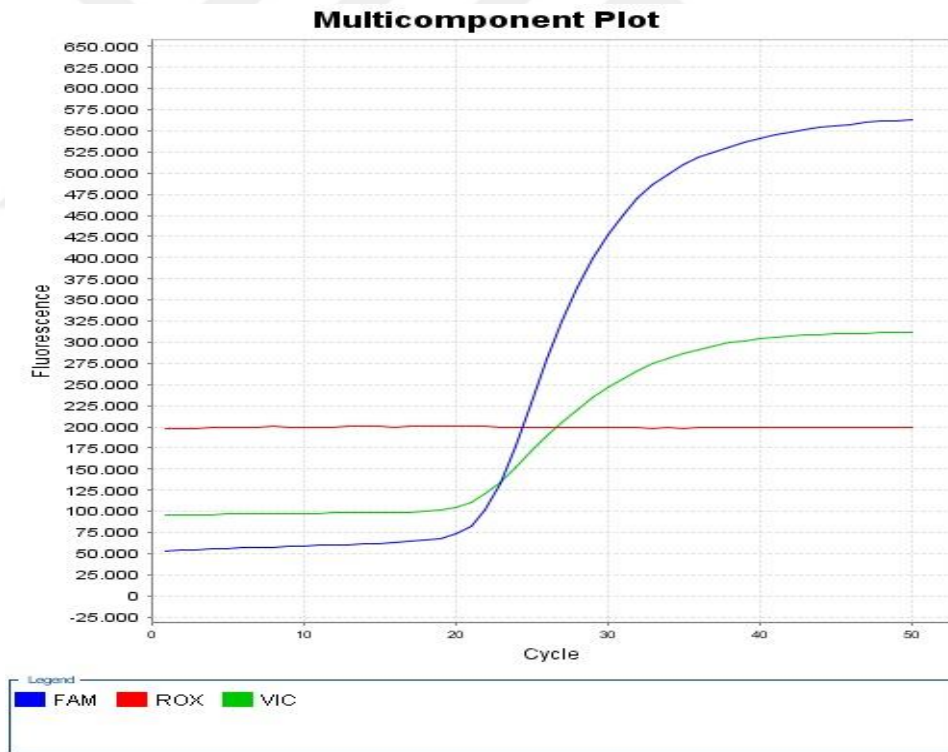
$$2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^{-(\Delta\Delta C_t \text{ örnek} - \Delta\Delta C_t \text{ kontrol})}$$

$$\Delta C_t (\text{örnek}) = C_t \text{ hedef gen} - C_t \text{ referans gen}$$

$$\Delta C_t (\text{kontrol}) = C_t \text{ hedef gen} - C_t \text{ referans gen}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{örnek}) - \Delta C_t (\text{kontrol})$$

şeklindedir [169]. Çalışmamızda hedef gen ekspresyon değişimleri, SDS 2.0.6 yazılımı ile $\Delta\Delta C_t$ değerleri kullanılarak belirlendi (Şekil 3.2). Veri normalizasyonu için ise $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri hesaplandı.



Şekil 3.2. Real-time PCR’da endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin ve hedef genin ekspresyon eğrisi. Kırmızı renkli yatay çizgi ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını, mavi renkli FAM ve yeşil renkli VIC eğrisi ise ekspresyon düzeyini ifade etmektedir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Miyeloid Hematolojik Malignansilerde miRNA Oluşum Yolağındaki Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması amacıyla yürütölen bu çalışmaya ait verilerin istatistiksel analizi Mersin Üniversitesi Tıp Faköltesi Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılım kontrolö Shapiro-Wilk istatistiği ile değerlendirildi. Grupların varyans homojenlik kontrolö ise Levene Testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyumlu olmayan ve varyansları homojen olmayan değerlere ait grup karşılaştırmaları non-parametrik yöntem Mann Whitney U Testi ile yapıldı. Özet istatistik olarak medyan ve %25-%75 değerleri verildi. Normal dağılıma uyumlu olan değerlere ait grup karşılaştırmaları bağımsız iki grup t testi ile yapıldı. Özet istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verildi. Kategorik değişkenler arasındaki ilişki ki-kare istatistiği ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

miRNA biyogenez yolağında yer alan genlerin (Drosha, Dicer, AGO1, AGO2, XPO5, TARBP2, DGCR8) ekspresyon düzeyleri;

- Toplam hasta (MDS-AML)-kontrol
- MDS -kontrol
- AML - kontrol
- MDS - AML hasta grupları arasında istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, hasta grubunda 43-88 yaş aralığındaki 54 birey, kontrol grubunda ise 55-76 yaş aralığında 7 birey olmak üzere toplamda 61 birey bulunmaktadır. Bu bireylerin 33'ünü (%54,1) erkekler oluştururken, 28'i (%45,9) ise kadın bireylerden oluşmaktadır. Çalışmamızda yer alan bireylerin yaş ortalamaları $65,45 \pm 8,2$ olarak hesaplandı. Cinsiyet bakımından değerlendirildiğinde ise hasta ve kontrol grubunda bulunan kadınların yaş ortalamaları $67,60 \pm 7,9$ iken bu oran erkeklerde $65,48 \pm 10,52$ olarak hesaplandı. Yaş ortalamaları bakımından erkek ve kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Kontrol ve hasta gruplarındaki kadın ve erkeklerin yaş ortalaması (n=birey sayısı)

	Cinsiyet	n	Yaş Ortalaması	p
Kontrol ve Hasta Grubu	Erkek	33	$67,60 \pm 7,9$	0,384
	Kadın	28	$65,48 \pm 10,52$	

4.1.1. Hasta Grubu

Çalışmamızın hasta grubunu 28'i kadın (%51,9) ve 26'sı erkek (%47,1) olmak üzere toplamda 54 birey oluşturmaktadır. Hasta grubumuzun yaş ortalaması $66,75 \pm 9,68$ olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş ortalamaları dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). Cinsiyetler açısından değerlendirildiğinde ise erkek bireylerin yaş ortalaması $65,75 \pm 10,96$ iken bu oran kadınlarda

67,84±8,16 olarak hesaplandı (Tablo 4.2). İstatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p=0,432).

4.1.2. Kontrol Grubu

Çalışmamızın kontrol grubunu 5'i erkek (%71,4) ve 2'si kadın (%28,6) olmak üzere toplamda 7 kişi oluşturmaktadır. Çalışmamızda yer alan kontrol bireylerinin yaş ortalaması 64,14±6,81 olarak hesaplandı. Kadın bireylerin yaş ortalaması 64,50±8,70 iken erkeklerde bu oran 64,00±8,33 olarak hesaplandı. Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (p>0,05) (Tablo 4.1.1). Hasta ve kontrol grubu cinsiyet açısından değerlendirildiğinde ise yine istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmadı (Tablo 4.3).

Tablo 4.2. Kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının cinsiyet açısından değerlendirilmesi (n=birey sayısı).

Grup	Cinsiyet	n	Yaş Ortalaması	p
Kontrol	Erkek	5	64,00±8,336	0,432
	Kadın	2	64,50±8,707	
Hasta	Erkek	28	65,75±10,96	0,939
	Kadın	26	67,84±8,166	

Tablo 4.3. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyet bakımından değerlendirilmesi (n=birey sayısı)

Cinsiyet	Grup				Toplam		p
	Kontrol		Hasta				
	n	%	n	%	n	%	0,565
Erkek	5	71,4	28	51,9	33	54,1	
Kadın	2	28,6	26	48,1	28	45,9	
Toplam	7	100,0	54	100,0	61	100,0	

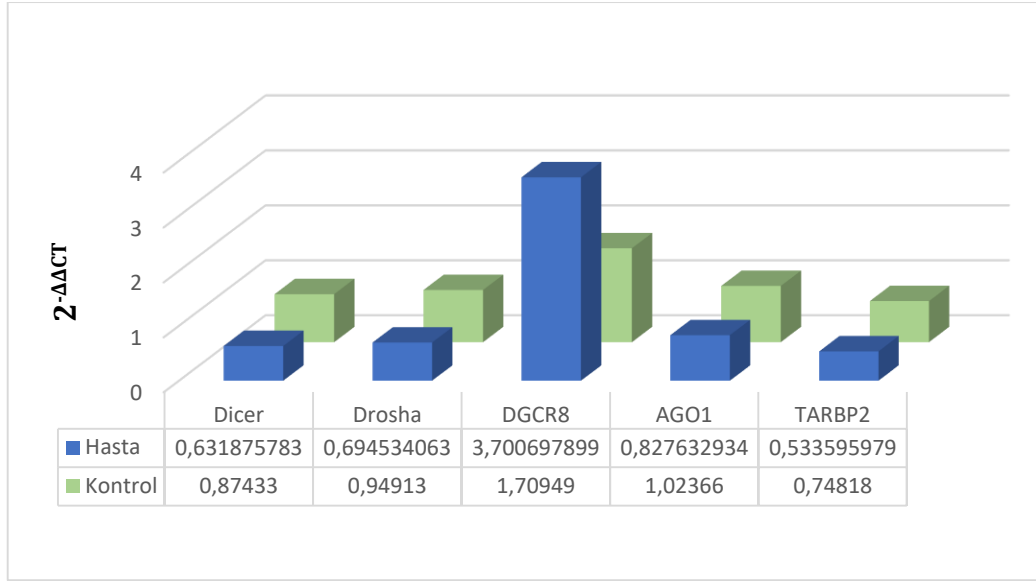
4.2. Toplam Hasta ve Kontrol Gruplarında Dicer, Drosha, DGCR8, XPO5, AGO1, AGO2, TARBP2, Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Analizi

miRNA biyogenez yolağının kilit elamanları olan Drosha, DGCR8, Dicer, XPO5, AGO1, AGO2 ve TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeyleri, kontrol ve hasta gruplarındaki dağılıma göre değerlendirilerek p değerleri hesaplandı. Sonuç olarak, *Dicer*, *Drosha*, *DGCR8*, *AGO1* ve *TARBP2* genlerinin ekspresyon düzeyleri açısından kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$) (Tablo 4.4) (Şekil 4.1). Hasta ve kontrol grubunda ilgili genlere ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’de belirtilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol ve hasta gruplarında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri (Q1=%25, Q3=%75).

Gen	Grup	N	Ekspresyon düzeyleri	(Min-Max)	[Q1-Q3]	p
<i>Dicer</i>	Kontrol	7	0,87433	(,701-3,172)	[0,86832-1,35224]	0,001
	Hasta	54	0,63187	(,186-2,054)	[0,04661-0,76654]	
<i>Drosha</i>	Kontrol	7	0,94913	(,697-2,024)	[0,76730-1,01193]	0,007
	Hasta	54	0,69453	(,130-1,887)	[0,05438 - 0,82206]	
<i>DGCR8</i>	Kontrol	7	1,70949	(,750-2,857)	[1,56790-1,99341]	<0,001
	Hasta	54	3,70069	(1,77327,311)	[2,85871 - 5,30012]	
<i>AGO1</i>	Kontrol	7	1,02366	(,838-2,116)	[0,88926-1,21478]	0,009
	Hasta	54	0,82763	(,191-1,632)	[0,70409 - 0,95451]	
<i>TARBP2</i>	Kontrol	7	0,74818	(,406-2,924)	[0,52420-0,88400]	0,012
	Hasta	54	0,53359	(,181-,814)	[0,44344 - 0,61829]	

Mann-Whitney U testi uygulanmıştır ($p < 0,05$).



Şekil 4.1. Kontrol ve hasta grupları arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi

Tablo 4.5. Hasta Grubunda Real-time Sonucu İlgili Genlere ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri

Hasta No	Dicer $2^{-\Delta\Delta CT}$	Drosha $2^{-\Delta\Delta CT}$	DGCR8 $2^{-\Delta\Delta CT}$	AGO1 $2^{-\Delta\Delta CT}$	TARBP2 $2^{-\Delta\Delta CT}$
AML-1	0,663946	0,752953	3,093598127	0,839314	0,566608
AML-2	0,675065	0,875951	3,145725489	0,79243	0,661449
AML-3	0,626266	0,633269	5,3334589	0,914259	0,607215
AML-4	0,780219	0,673155	3,861944675	0,915571	0,736069
AML-5	0,637485	0,687801	2,243668079	0,874878	0,723215
AML-6	0,525128	0,517927	3,817491055	0,646185	0,476225
AML-7	0,715019	0,735942	3,112386942	0,767688	0,553108
AML-8	0,805194	0,810919	3,621258259	0,916768	0,609694
AML-9	0,748713	0,728587	3,424343348	1,047655	0,625383
AML-10	0,818688	0,887849	2,703570366	1,049135	0,672957
AML-11	0,595569	0,614339	6,684501171	0,876557	0,642802
AML-12	0,732222	0,648333	2,704435587	1,036963	0,691058
AML-13	0,683024	0,716548	3,701448917	0,83141	0,521357
AML-14	0,409798	0,514893	8,375500679	0,532002	0,666652
AML-15	0,786708	0,924107	27,31092262	0,950948	0,524536
AML-16	0,558751	0,660551	3,843307734	0,720898	0,537436
AML-17	0,314775	0,41926	2,137423754	0,396857	0,302603
AML-18	0,675192	0,701267	3,194973946	0,797678	0,615933
AML-19	0,69337	0,780243	4,383055687	0,738434	0,46671
AML-20	0,408932	0,539148	3,279639482	0,588473	0,370979
MDS-1	0,835099	0,888512	2,911639929	1,081413	0,65355
MDS-2	1,077149	1,588755	4,883818626	1,085019	0,768604
MDS-3	2,053518	1,421393	5,289011002	1,026869	0,530584
MDS-4	0,210536	0,130359	2,478247881	0,190579	0,180521
MDS-5	0,786815	0,803667	1,772758961	1,038942	0,691574
MDS-6	0,384587	0,278764	5,057567596	0,377421	0,416406
MDS-7	0,617431	0,675746	4,601622581	0,790986	0,814429
MDS-8	0,819703	0,775623	3,065197706	0,786107	0,678556
MDS-9	0,640315	0,726872	2,859298468	0,863568	0,520045
MDS-10	0,925595	1,17404	2,009448528	1,301236	0,607673
MDS-11	1,27323	1,886904	2,856955767	1,4887	0,560016
MDS-12	0,787387	0,840752	5,447602749	0,964742	0,536608
MDS-13	0,48349	0,516513	7,000819206	0,729475	0,566261
MDS-14	0,761994	0,950103	5,8454175	0,998407	0,539407
MDS-15	0,195917	0,18228	12,65346718	0,348817	0,507178
MDS-16	0,491357	0,588714	7,064909458	0,697694	0,42142
MDS-17	0,451726	0,535921	5,439139366	0,615626	0,559952
MDS-18	0,186319	0,847706	2,038923025	1,631965	0,26202
MDS-19	0,340192	0,733415	2,307183743	0,871327	0,328018
MDS-20	0,300516	0,349312	3,915028334	0,446607	0,343535
MDS-21	0,568321	0,81584	5,936122894	0,745954	0,478283
MDS-22	0,300739	0,338525	4,923351288	0,457036	0,335167
MDS-23	0,470932	0,644539	4,045680046	0,725364	0,500031
MDS-24	0,48637	0,545406	2,561730385	0,706226	0,375864
MDS-25	0,712514	0,759644	3,69994688	0,748232	0,454499
MDS-26	0,535347	0,624328	2,667410135	0,791359	0,568865
MDS-27	0,57791	0,685113	3,387460947	0,826784	0,572705
MDS-28	0,67286	0,771599	4,068018913	0,866663	0,50175
MDS-29	0,563887	0,632165	8,065855026	0,828482	0,452292
MDS-30	1,138914	1,078245	4,490647793	0,95111	0,450783
MDS-31	0,738437	0,914511	5,897706032	1,054476	0,47224
MDS-32	0,347371	0,4397	3,305006742	0,395821	0,314385
MDS-33	0,319315	0,350668	3,658190012	0,588278	0,257224
MDS-34	0,524517	0,608177	2,688102245	0,883619	0,405018

Tablo 4.6. Kontrol Grubunda Real-time Sonucu İlgili Genlere ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ Değerleri

Kontrol No	Dicer $2^{-\Delta\Delta CT}$	Drosha $2^{-\Delta\Delta CT}$	DGCR8 $2^{-\Delta\Delta CT}$	AGO1 $2^{-\Delta\Delta CT}$	TARBP2 $2^{-\Delta\Delta CT}$
1	0,701129	0,767299	1,709494	0,889262	0,405997574
2	1,028187	1,01192963	1,754078	1,125319	0,848636091
3	1,352241	0,9183495	1,993414	1,214783	0,883997977
4	0,868324	0,94912952	2,857152	1,023659	0,748177946
5	0,870335	0,69654971	1,692269	0,957345	0,703264773
6	3,171705	2,02413487	0,749561	2,116284	2,923659325
7	0,874333	0,97547585	1,567903	0,838482	0,524200141

XPO5 ve AGO2 genlerinin ekspresyon düzeyleri hem kontrol hem de hasta grubunda saptanamadı. Bu nedenle bu genlerin ekspresyon düzeylerine ilişkin veriler istatistiksel değerlendirmeye alınamadı. Her iki genin ekspresyon düzeylerinin saptanabilmesi için Real-time PCR şartları (primer-prob bağlanma sıcaklığı) değiştirilerek çalışma tekrar edildi. Aynı zamanda cDNA örnek miktarlarının az olabileceği düşüncesine karşı farklı örneklerden alınan cDNA miktarları arttırılarak Real-time tekrarlandı. Herhangi bir sonuç alınamaması neticesinde daha önce $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olan kalıp RNA miktarı, $4\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olacak şekilde arttırılarak örneklerden cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örneklerinden farklı miktarlarda (5, 10 ve $20\mu\text{l}$) kullanılarak çalışma tekrar edildi ve yine her iki gene ait ekspresyon düzeyi saptanamadı. Son olarak, farklı dokular (kan, amniyon ve kemik iliği) kullanılarak yapılan çalışmada, amniyon örneklerinde XPO5 gen ekspresyonunun olduğu fakat buna karşın kan ve kemik iliği örneklerinde gözlenmediği saptandı. AGO2 geninin amniyon ve kan dokularında ekspresyonu gözlenirken çalışma grubumuza ait kemik iliği örneklerinde ise eksprese olmadığı veya çok az eksprese olması nedeniyle florasan emilimi zemin çizgisinin üzerine çıkacak ölçüde olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2)(Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Real-time PCR'da AGO2 genine ait ekspresyon eğrisi. Kırmızı renkli yatay çizgi ROX (6-Karboksi-X-Rhodamin) pasif referans boyasını, mavi renkli FAM ve yeşil renkli VIC eğrisi ise ekspresyon düzeyini ifade etmektedir.

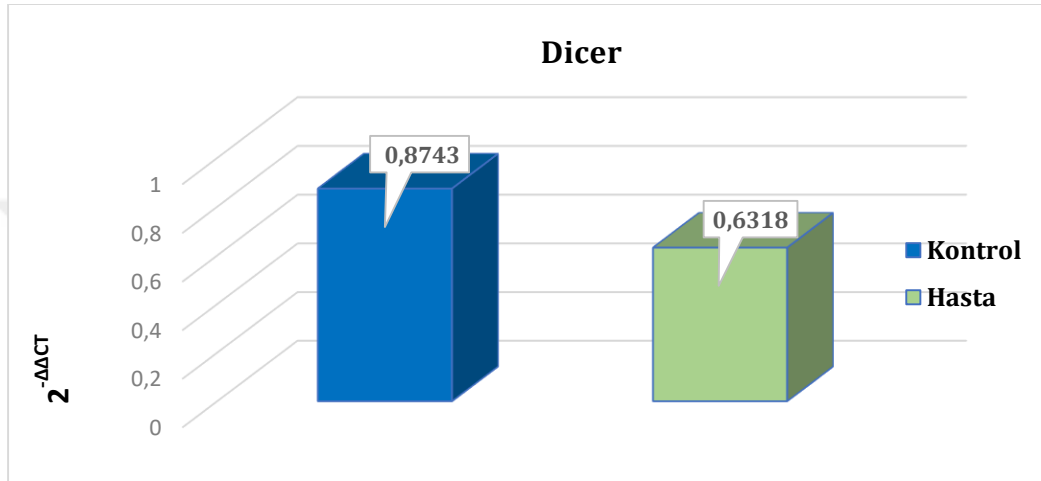
XP05 ve AGO2 genlerinin ABI (Foster City, CA, USA) insan kontrol RNA'sında eksprese olması primer-prob tasarımı bir problem olmadığı düşüncesini akla getirmektedir (Şekil 4.3). Burdan yola çıkarak çalışma grubumuzu oluşturan kemik iliği örneklerinde XP05 ve AGO2 ekspresyonlarının çok düşük düzeyde olduğu düşünüldü.



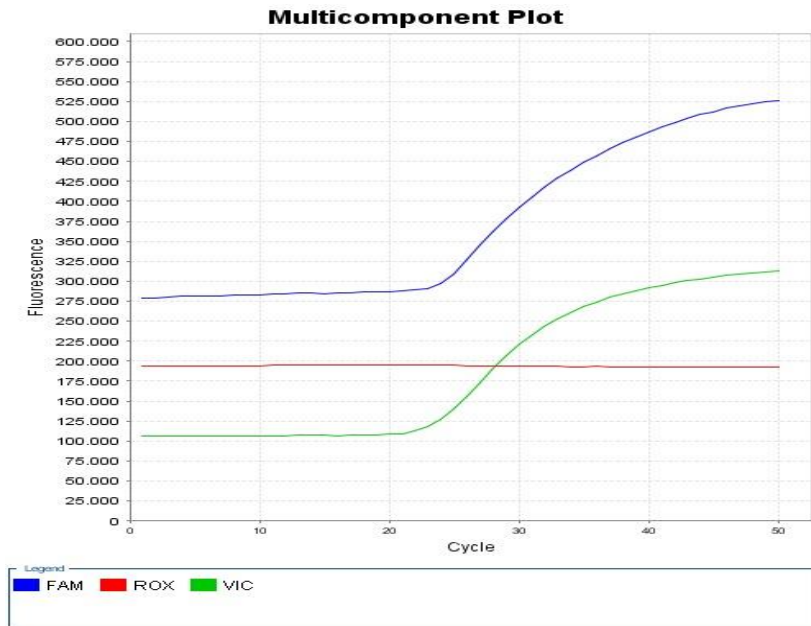
Şekil 4.3. Real Time PCR'da ABI kontrol RNA'sına ait β -aktin (VIC boyası) ve hedef genin (FAM boyası) ekspresyon eğrisi.

4.2.1. Dicer Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Dicer geninin ekspresyon düzeyinin kontrol grubunda $2^{-\Delta\Delta CT} = 0,87433$, hasta grubunda ise 0,63187 olduğu gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri kıyaslandığında hasta grubunda kontrol grubuna oranla 1,38 kat azalma olduğu saptandı. Gruplar arasında Dicer genine ait ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.4) (Şekil 4.5).



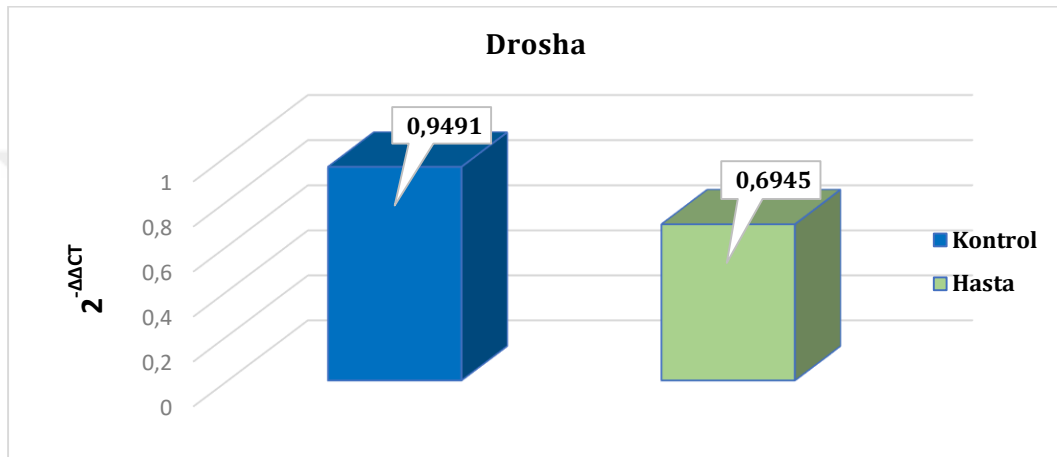
Şekil 4.4. Kontrol ve hasta grubunda Dicer genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi



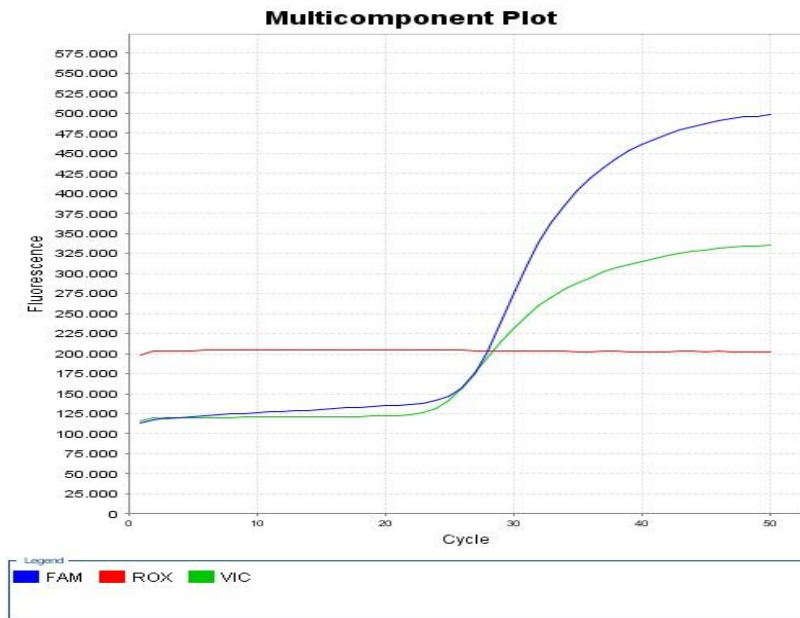
Şekil 4.5. Real-time PCR'da Dicer (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.

4.2.2. Drosha Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Yapılan istatistiksel analizde Drosha genine ait ekspresyon düzeyinin kontrol grubunda 0,94913 iken hasta grubunda 0,69453 olduğu saptandı. Ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında hasta grubunda kontrol grubuna göre 1,37 kat azalma olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grupları arasında Drosha gen ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 4.6). Drosha genine ait Real-time ekspresyon eğrisi Şekil 4.7’de gösterilmektedir.



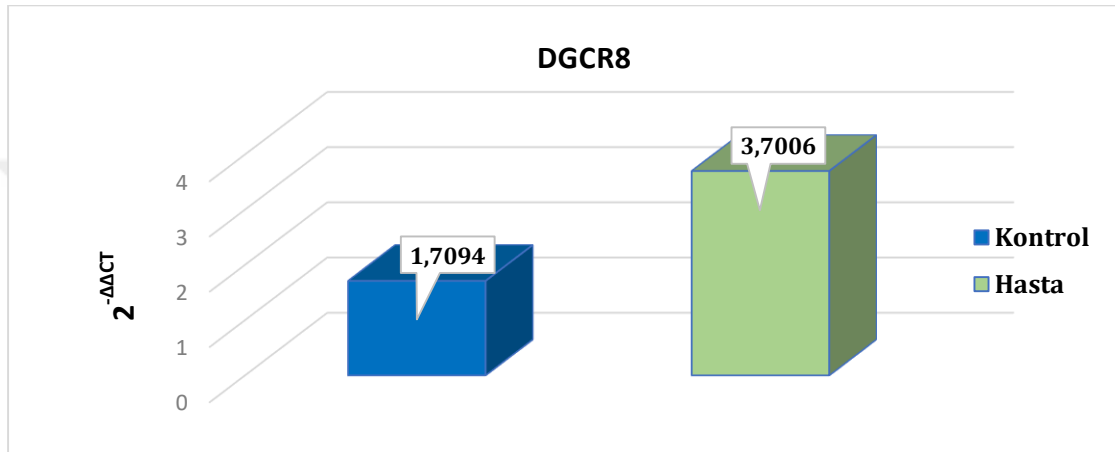
Şekil 4.6. Kontrol ve hasta grubunda Drosha genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi



Şekil 4.7. Real-time PCR’da Drosha (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.

4.2.3. DGCR8 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda DGCR8 gen ekspresyon düzeyinin 1,70949, hasta grubunda ise 3,70069 olduğu gözlenirken, ekspresyon düzeyleri dikkate alındığında hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla 2,16 kat artış olduğu saptandı. Kontrol ve hasta grubunda DGCR8 ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 4.8). DGCR8 genine ait Real-time ekspresyon eğrisi Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



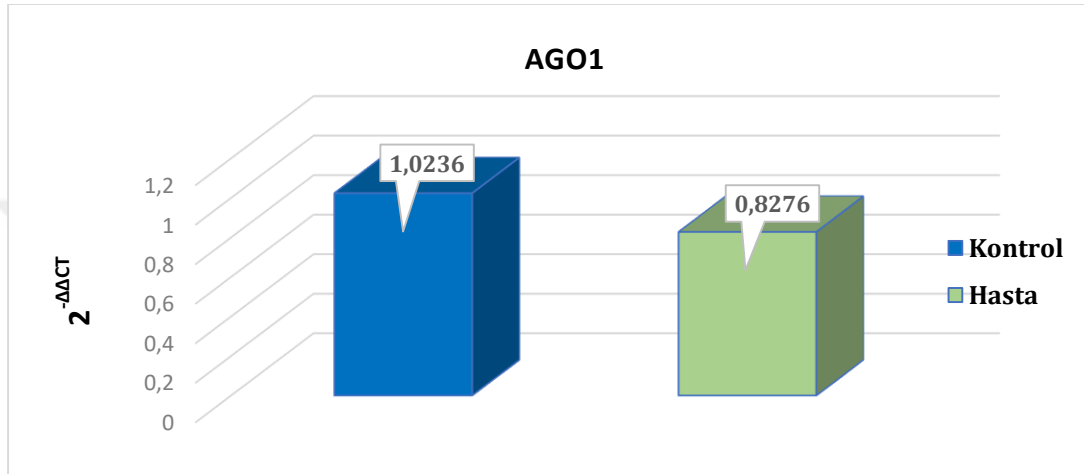
Şekil 4.8. Kontrol ve hasta grubunda DGCR8 genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi.



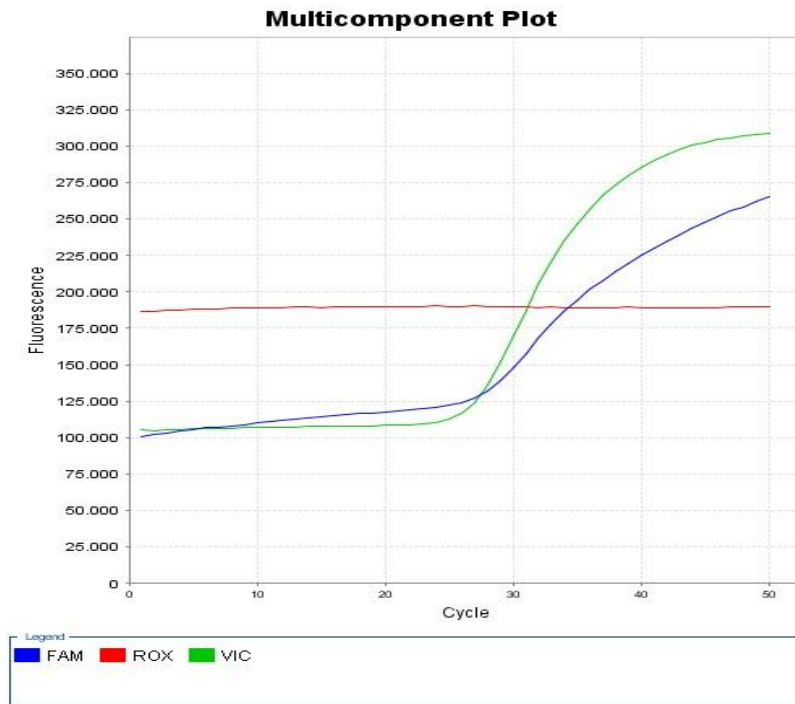
Şekil 4.9. Real-time PCR'da DGCR8 (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.

4.2.4. AGO1 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda ekspresyon düzeyinin 1,02366, hasta grubunda ise 0,82763 olduğu gözlemlendi. Ekspresyon düzeyleri açısından hasta grubunda kontrol grubuna oranla 1,24 kat azalma saptanırken, kontrol ve hasta grupları arasında DGCR8 ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.10). DGCR8 genine ait Real-time ekspresyon eğrisi Şekil 4.11’de gösterilmektedir.



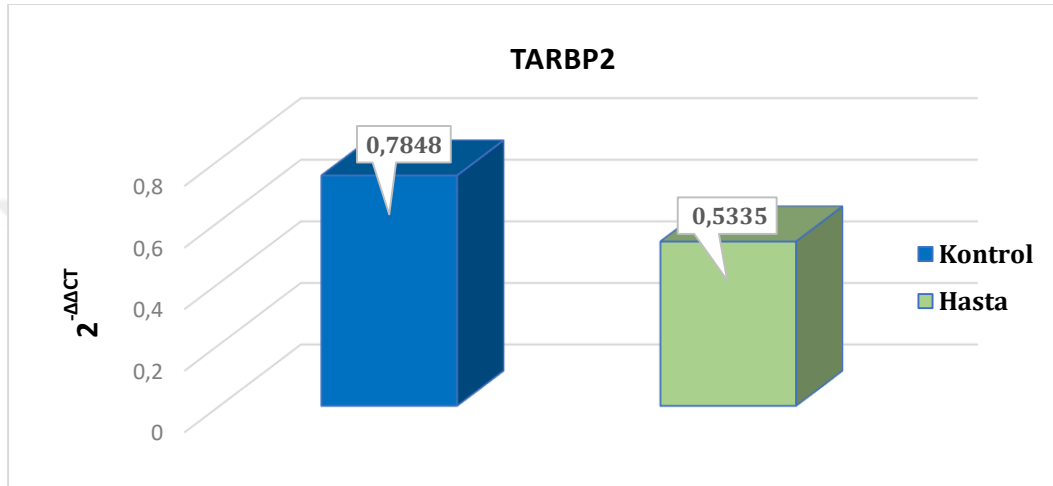
Şekil 4.10. Kontrol ve hasta grubunda AGO1 genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi



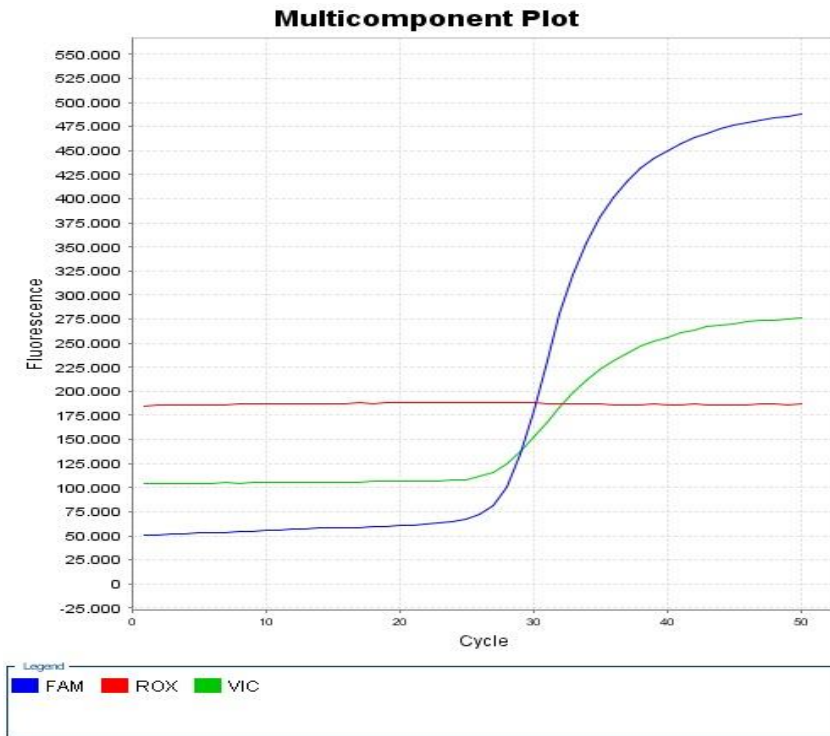
Şekil 4.11. Real-time PCR’da AGO1 (FAM ile boyanan) ve β-aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.

4.2.5. TARBP2 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda TARBP2 ekspresyon düzeyinin 0,74818, hasta grubunda ise bu oranın 0,53359 olduğu gözlemlendi. Hasta grubunda kontrol grubuna oranla ekspresyon düzeylerinde 1,4 kat azalma olduğu bulundu. Bu azalma dikkate alındığında, kontrol ve hasta gruplar arasında TARBP2 genine ait ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p < 0,05$). TARBP2 genine ait Real-time ekspresyon eğrisi Şekil 4.13’de gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Kontrol ve hasta grubunda TARBP2 genine ait ekspresyon düzeyinin grafiksel gösterimi



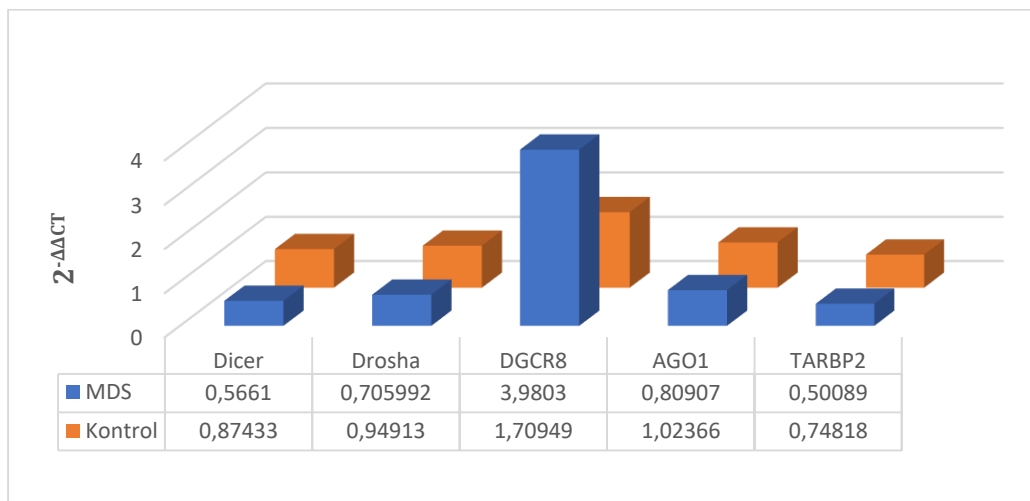
Şekil 4.13. Real-time PCR’da TARBP2 geni (FAM ile boyanan) ve β -aktin genine (VIC ile boyanan) ait ekspresyon eğrisi.

4.3. MDS Hastaları ve Kontrol Grubu Arasında Gen Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Drosha, DGCR8, Dicer, AGO1 ve TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeyleri, MDS ve kontrol grubunda arasında ayrı ayrı değerlendirilerek bunlara ait p değerleri hesaplandı. MDS ve kontrol grupları arasında Drosha, DGCR8, Dicer, AGO1 ve TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu grupta Drosha, Dicer, AGO, TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla MDS grubunda azalma gösterirken, DGCR8 genindeki ekspresyon düzeyi kontrole kıyasla MDS hastalarında yüksek bulundu (Tablo 4.7)(Şekil 4.14).

Tablo 4.7. MDS ve Kontrol grubu arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri (Q1=%25, Q3=%75).

Gen	Grup	N	Ekspresyon düzeyleri	(Min-Max)	[Q1-Q3]	p
Dicer	MDS	34	0,56610	(0,186-2,054)	[0,375280-0,78695]	0,003
	Kontrol	7	0,87433	(0,701-3,712)	[0,86832-1,35224]	
Drosha	MDS	34	0,705992	(0,130-1,887)	[0,53106-0,85790]	0,022
	Kontrol	7	0,94913	(0,697-2,024)	[0,76730-1,01193]	
DGCR8	MDS	34	3,9803	(1,773-12,653)	[2,81474-5,44125]	<0,001
	Kontrol	7	1,70949	(0,750-2,857)	[1,56790-1,99341]	
AGO1	MDS	30	0,80907	(0,191-1,632)	[0,67717-1,0055]	0,017
	Kontrol	7	1,02366	(0,838-2,116)	[0,88926-1,21478]	
TARBP2	MDS	34	0,50089	(0,181-0,814)	[0,39772 -0,56691]	0,008
	Kontrol	7	0,74818	(0,406-2,924)	[0,52420-0,88400]	



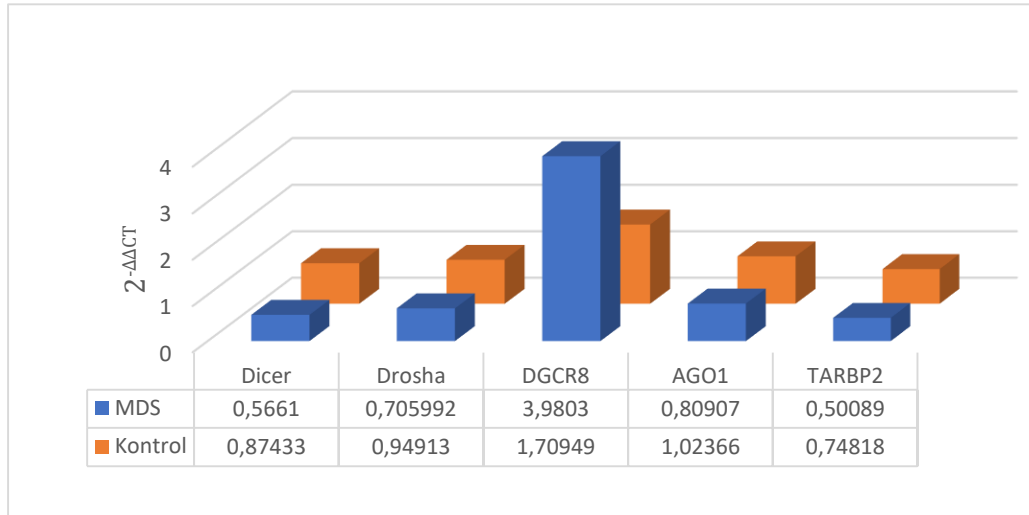
Şekil 4.14. MDS ve kontrol gruplarında ilgili genlere ait ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi

4.4. AML Hastaları ve Kontrol Grubu Arasında Gen Ekspresyon Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Drosha, DGCR8, Dicer, AGO1 ve TARBP2 genlerinin ekspresyon düzeyleri, AML ve kontrol grubu arasında değerlendirilerek p değeri hesaplandı. Yapılan istatistiksel analiz neticesinde AML ve kontrol grupları arasında Drosha, DGCR8, Dicer, AGO1 genlerinin ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir fark saptanırken ($p < 0,05$), TARBP2 geninin ekspresyon düzeyi bakımından gruplar arasında bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p > 0,05$). Drosha, Dicer, AGO1 genlerinin ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna kıyasla AML grubunda azalma gösterirken, DGCR8 genindeki ekspresyon düzeyinin AML hastalarında yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 4.8)(Şekil 4.15).

Tablo 4.8. AML ve Kontrol grubu arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri (Q1=%25, Q3=%75).

Gen	Grup	N	Ekspresyon düzeyleri	(Min-Max)	[Q1-Q3]	p
Dicer	AML	20	0,67512	(0,315-0,819)	[0,5679-0,7445]	<0,001
	Kontrol	7	0,87433	(0,701-3,712)	[0,8683-1,35224]	
Drosha	AML	20	0,694534	(0,419-0,924)	[0,61907-0,77342]	0,003
	Kontrol	7	0,94913	(0,697-2,024)	[0,76730-1,01193]	
DGCR8	AML	20	3,52280	(2,137-27,311)	[3,09829-4,25277]	<0,001
	Kontrol	7	1,70949	(0,750-2,857)	[1,56790-1,99341]	
AGO1	AML	20	0,83536	(0,397-1,049)	[0,72528 -0,91646]	0,009
	Kontrol	7	1,02366	(0,838-2,116)	[0,88926-1,21478]	
TARBP2	AML	20	0,60845	(0,303-0,736)	[0,52215 -0,66535]	0,053
	Kontrol	7	0,74818	(0,406-2,924)	[0,52420-0,88400]	



Şekil 4.15. AML ve kontrol gruplarında ilgili genlere ait ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi

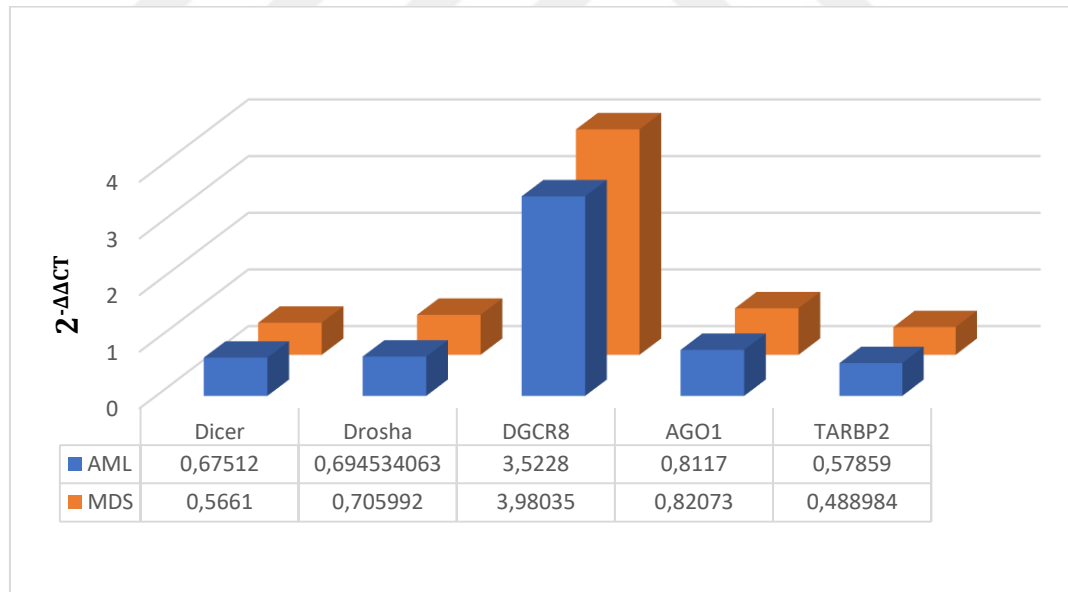
4.5. MDS ve AML Hasta Grupları Arasında Gen Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

MDS, heterojen yapısının yanı sıra AML'ye dönüşme özelliğine sahip bir malignensidir. Dolayısıyla burdan yola çıkarak, Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 gen ekspresyon düzeyleri bakımından AML ve MDS hasta grupları arasında bir farklılık olup olmadığını araştırdık. Sonuç olarak; Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ($p>0,05$), TARBP2 ekspresyon düzeyinde ise anlamlı bir farklılık saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4.9). AML-MDS hasta grupları arasında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon düzeyleri Şekil 4.16'da grafiksel olarak yer almaktadır.

Tablo 4.9. AML ve MDS hasta gruplarında Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1 ve TARBP2 genlerine ait ekspresyon ($2^{-\Delta\Delta CT}$) ve p değerleri (Q1=%25, Q3=%75).

Gen	Grup	N	Ekspresyon düzeyleri	(Min-Max)	[Q1-Q3]	p
<i>Dicer</i>	AML	20	0,67512	(0,315-0,819)	[0,56795-0,74459]	0,316
	MDS	34	0,56610	(0,186-2,054)	[0,37528-0,78695]	
<i>Drosha</i>	AML	20	0,694534	(0,419-0,924)	[0,61907-0,77342]	0,900
	MDS	34	0,705992	(0,130-1,887)	[0,53106-0,85790]	
<i>DGCR8</i>	AML	20	3,52280	(2,137-27,311)	[3,09829-4,25277]	0,654
	MDS	34	3,98035	(1,773-12,653)	[2,81474-5,44125]	
<i>AGO1</i>	AML	20	0,81170	(0,397-1,049)	[0,89226-0,76478]	0,905
	MDS	34	0,82073	(0,191-1,632)	[0,80409 -0,85471]	
<i>TARBP2</i>	AML	20	0,57859	(0,303-0,736)	[0,48520-0,68400]	0,020
	MDS	34	0,488984	(0,181-0,814)	[0,46344 -0,53829]	

Mann-Whitney U testi uygulanmıştır (p<0,05)

**Şekil 4.16.** AML ve MDS hasta gruplarında ilgili genlere ait ekspresyon düzeylerinin grafiksel gösterimi

4.6. Tartışma

Kanser, genomda çok sayıda değişim içeren kompleks bir hastalıktır. Kanser genomunda çalışmalar çoğunlukla, protein kodlayan genler üzerine yoğunlaşsa da fonksiyonel kodlanmayan sekanslardaki değişimlerin de kanserde rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. miRNA'lar küçük, endojen RNA'lar olarak adlandırılırlar ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alırlar [170]. Memelilerde, miRNA'lar, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma, hücre siklusunun düzenlenmesi, hematopoez ve hatta birçok hücrel süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA ve miRNA biyogenez yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyleri ile kanser de dahil olmak üzere birçok hastalık arasındaki ilişki üzerine yoğunlaşmıştır. Gelişimdeki rolleri dikkate alındığında miRNA'ların tümör oluşumu üzerine önemli roller üstlendiği düşünülmektedir. Keşiflerini takiben bu zamana kadar miRNA'lar ile ilgili yapılan yaklaşık 3000 çalışmanın 700'den fazlası kanser üzerinedir. Tek bir miRNA, transkripsiyon faktörleri, reseptörler ve taşıyıcı proteinler üzerinde çeşitli fonksiyonları olan 200'den fazla hedef gene bağlanabilme potansiyeli gösterir. Böylelikle miRNA'lar, tüm mRNA'ların yaklaşık üçte birinin ekspresyonunu kontrol ederken ekspresyon sırasında meydana gelebilecek modifikasyonlar, çeşitli hastalıkların oluşumuna zemin hazırlamakla beraber bazı yollarda aksamaya neden olarak neoplazi oluşumuna aracılık edebilir [171].

Çoğu gelişimsel süreçte spesifik gen transkriptlerinin miRNA'lar tarafından düzenlenmesi nedeniyle, miRNA'larda meydana gelen fonksiyon bozuklukları, defektif hücrel proliferasyon ve differansiyasyon bozukluklarından köken alan AML ve MDS gibi miyeloid hematolojik malignansilerin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Örneğin; miR-155, *NPM1* mutasyonu taşıyan AML hastalarında upregüledir. Hematopoietik kök hücrelerde miR-155'in aşırı ekspresyonu, miyeloid öncül hücrelerin proliferasyonunu artırırken, eritrosit ve megakaryositlere farklılaşmasını bloklar. miR-125a ekspresyonu, sitogenetik olarak normal olan AML hastalarında çoğunlukla azalma göstermekle beraber bu bireylerde yaşam süresinin azalmasıyla da ilişkilendirilmiştir. Hematopoezde görevli miR-130a, miR-10a, miR-181, miR-451 gibi bazı miRNA'ların da AML hastalarında deregüle olduğu gözlemlenmiştir MDS'de ise miR-146a, miR-150, let-7a, miR-17-5p düşük düzeyde eksprese edilirken, miR-34a, miR-22 yüksek düzeyde eksprese edilmektedir [159]. AML ve MDS, hayli heterojen özellik gösteren malignansilerdir ve miyeloid öncü hücrelerin olgun kan hücrelerine differansiyasyonunun bozulmasıyla karakterizedir. Kromozom translokasyonları, inversiyonlar, gen delesyonları ve mutasyonları içeren genetik ve genomik anomalilere ilaveten, bazı miRNA'lar tarafından post-transkripsiyonel düzenlenmedeki değişimler AML ve MDS ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerin de bu miyeloid malignansilerin oluşumuna aracılık ettiği rapor edilmiştir [162,172].

miRNA ekspresyon düzeyindeki değişimlerin altında yatan nedenler ve mekanizma hakkındaki mevcut bilgiler sınırlıdır. Bu ekspresyon değişimlerinin AML ve MDS’de sıklıkla deregüle olması farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır; kopya sayısı değişimleri, epigenetik değişimler, kromozomal translokasyonlar nedeniyle miRNA lokasyonunun onkogenik genomik bölgelere yakın olması veya protein kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu, miRNA promotor bölgelerinin farklı transkripsiyon faktörleri ve onkoproteinlerce hedef alınması ve son olarak miRNA biyogenez yolağında yer alan genlerin deregülasyonu [173]. Literatür taraması sonucu, tüm bu mekanizmalar arasında özellikle miRNA biyogenez yolağındaki enzimlerin ekspresyon düzeyindeki değişimler birçok kanser türü ile ilişkilendirilirken, AML ve MDS gibi miyeloid hematolojik malignansilerde bu genlerdeki olası ekspresyon değişimlerini araştıran çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, hematopoezin kritik düzenleyicileri olan miRNA’ların biyogenez yolağında yer alan Dicer, Drosha, DGCR8, AGO1-2, TARBP2 ve XPO5 genlerindeki ekspresyon değişimleri ile miyeloid hematolojik malignansiler (AML ve MDS) arasındaki ilişki incelendi.

Mikroişlemci kompleksinin iki üyesinden biri olan DGCR8, çift zincirli RNA bağlanma proteindir ve miRNA biyogenez yolağının kilit bileşenlerinden biridir. Drosha ile etkileşime girerek miRNA olgunlaşmasını kolaylaştırır. Bu nedenle bu genin ekspresyonunda meydana gelen defektler, miRNA olgunlaşmasını, diğer bir ifadeyle miRNA gen ekspresyonunu etkiler. DGCR8, protein-protein etkileşimi yoluyla Drosha proteinini stabilize eder ve pri-miRNA hairpin yapısında bağlanarak Drosha tarafından kesilecek bölgeyi belirler. Dolayısıyla doğru bölgenin kesilmesi ve etkin miRNA olgunlaşması açısından kritik bir proteindir [8]. DGCR8 geninin ekspresyon düzeyindeki değişimler literatürde çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir. Literatür taraması neticesinde bu genin ekspresyon düzeyindeki azalma ile kanser arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı sınırlıdır.

Kitagawa ve arkadaşları (2013), miRNA biyogenez genlerinin ekspresyon düzeyleri ile hepatoselüler karsinoma arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada, DGCR8 gen ekspresyonundaki azalmanın bu hastalarda kötü prognozla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın aksine Kwon ve arkadaşları (2014), meme kanseri gelişimindeki rollerini ortaya koymak için 52 invazif meme karsinom dokusu ile kontrol kıyaslamasında DGCR8 geninin ekspresyon düzeyindeki artışın, meme kanseri patobiyolojisinde önemli bir rol oynayabileceği ve önemli klinik parametrelerle ilişkili olabileceğini ortaya koymuştur [174]. Benzer şekilde, Guo ve arkadaşları (2015) SKOV3 hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada, DGCR8 geninin susturulmasının ovaryum kanseri üzerindeki etkisini araştırmış ve normal dokulara oranla ovaryum kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda bu kanser hücre tipinde, DGCR8’in susturulması hücre proliferasyonu, migrasyon ve invazyonda azalmaya yol açarken kemoteröpatik ilaçlara karşı hücrelerin apoptoza yatkınlığını arttırmaktadır. Bu baskılanmanın, hücrelerin yaşamını devam ettirmesini sağlayan

ERK1/2 ve PI3K/AKT yolaklarını sekteye uğratması, DGCR8 geninin olasılıkla hücre büyümesini teşvik eden bir onkogen olarak fonksiyon gösterdiği fikrini ileri sürmektedir [175]. Benzer şekilde Kim ve arkadaşları (2014), kolorektal adenokarsinomlarda DGCR8 ekspresyon düzeyinin arttığını ve böylelikle kolorektal karsinogenez oluşumunda bu gendeki ekspresyon düzeyinin değişiminin önemini vurgulamışlardır [176]. Bu bulgular, DGCR8 ekspresyonundaki artış veya azalışın kanser tipine bağlı olarak değiştiğini fakat sonuç olarak kanser gelişimine aracılık ettiğini ortaya koymaktadır. miRNA disfonksiyonunun hematolojik malignansilerin oluşumuna aracılık ettiği bilinmektedir. Daha önce B hücre hattı, T hücre hattı ve kontrol çalışmalarında DGCR8 ekspresyon düzeyi ölçülmüş ve B hücre malignansilerinde ekspresyon düzeyi artarken, T hücre malignansilerinde ise azaldığı rapor edilmiştir. Bu proteinin işlevi veya malignensi oluşumundaki rolü az bilindiği için gen ekspresyon farklılığının nedenleri değerlendirilememiştir [177].

Araştırmamızda, AML ve MDS hastalarına ait kemik iliği örneklerinde DGCR8 gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna kıyasla ($2^{\Delta\Delta CT}=1,70949$) hastalarda ($2^{-\Delta\Delta CT}=3,70069$) 2,16 kat artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. MDS hasta grubu ile kontrol grubunu kıyasladığımızda, DGCR8 gen ekspresyonu hastalarda ($2^{-\Delta\Delta CT}=3,9803$) kontrollere göre ($2^{-\Delta\Delta CT}= 1,70949$) 2,32 kat artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. AML hastalarında da bu genin ekspresyon düzeyi kontrollere kıyasla 2,06 katlık bir artış gösterdi. AML-MDS grupları arasında ise DGCR8 gen ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Bu bulgular ışığında, bu genin diğer kanser türlerindeki kilit fonksiyonu dikkate alındığında ekspresyon düzeyindeki artışın AML ve MDS gibi miyeloid hematolojik malignansilerin oluşumuna aracılık ettiği düşünülmektedir. Buna karşın, MDS'den AML'ye dönüşümde rol oynamadığı ileri sürülebilir. DGCR8 genindeki ekspresyon düzeyinin artışına neden olan mekanizmalarla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır.

Gomez-Cabello ve arkadaşları (2010) ING (inhibitor of growth protein) tümör baskılayıcı protein ailesinin üyesi olan ING1'in DGCR8 ekspresyonunu kontrol ettiğini ortaya çıkarmıştır [178]. Bu protein ailesi, hücre siklusunun kontrolü, apoptoz, yaşlanma veya migrasyon gibi birçok hücresel fonksiyonu kontrol etmektedir. ING1, direkt olarak DGCR8 promotoruna bağlanarak kromatin regülasyonu aracılığıyla DGCR8 ekspresyonunu transkripsiyonel olarak kontrol eder. İnvazif meme karsinoması veya glioblastoma gibi tümörlerde ING1 ve DGCR8 ekspresyonu arasında ters korelasyon olduğu rapor edilmiştir. İnsan malignansilerinde ING1 geninin ekspresyonunun sıklıkla azalması, DGCR8 genin ekspresyonunun artışıyla paralellik gösterebilir [179]. AML ve MDS hastalarında bu genin ekspresyon düzeyinin incelenmesi, DGCR8 ekspresyon düzeyi hakkında bilgi sahibi olmamıza olanak sağlayabilir. Benzer şekilde, DGCR8 ekspresyonu, Drosha-DGCR8 kompleksi tarafından post-transkripsiyonel düzeyde negatif olarak kontrol edilir. Diğer bir ifadeyle hücrede her iki proteinin ekspresyon düzeyi yüksek ise bu kompleks yıkılır ve

DGCR8 mRNA'sını destabilize ederek DGCR8 ekspresyonunda azalmaya yol açar. DGCR8 tarafından Drosha'nın stabilizasyonu, bir oto düzenleyici feed-back mekanizması olarak adlandırılır ve miRNA biyogenezinin homeostatik kontrolünün devamlılığını sağlar. Bu bilgiyi doğrular şekilde Triboulet ve arkadaşları (2009), mikroişlemci kompleksinin aktivitesini düzenlemede her iki proteinin de gerekliliğini ortaya koyarken, bu proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen mekanizmanın bilinmemesi üzerine, yapmış oldukları çalışmada, DGCR8 mRNA'sının 5-UTR bölgesinde lokalize hairpin yapısının mikroişlemci kompleksi tarafından yıkıldığını rapor etmişlerdir. Drosha aktivitesindeki bozukluğunun DGCR8 mRNA'sı ve protein düzeyinde azalmaya yol açtığını belirtmişlerdir [136].

Çalışmamızda, kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda DGCR8 gen ekspresyonunda artış gözlenirken aksine Drosha geninin ekspresyon düzeyinde azalma görüldü. Dolayısı ile bu bulgu, çalışmamızı destekler niteliktedir.

miRNA'ların olgunlaşma süreci pre-miRNA'ların işlenmesiyle başlar. Bu basamakta DGCR8 ile birlikte işlev gören Drosha, RNaz III ailesinin bir üyesidir ve çift zincirli RNA'ların yıkımından sorumludur [180]. RNASEN olarak da bilinen Drosha geni insanlarda 5. kromozomda yer almaktadır ve bu genin ürünü olan Drosha proteini birçok domainden oluşan 130-160 kDa moleküler ağırlığına sahip, büyük, nükleer bir proteindir. pri-miRNA işlenme sürecinde ne DGCR8 ne de Drosha'nın tek başına aktif olmamaları, her iki proteinin de bu süreçte kritik rol oynadığını göstermektedir [139]. Fonksiyonel miRNA'ların oluşumundaki kritik basamaklardan biri de Drosha enziminin pri-miRNA'yı doğru bölgeden kesmesidir. Drosha, miRNA biyogenezinde görev alan ve böylelikle hücrel homeostazın korunması ve gelişimsel süreçler bakımından önemli faktörlerden biridir [181].

Mutasyonel analizler; Drosha geninin bazı tümör dokularında büyük oranda mutasyona uğradığını ortaya koymaktadır. Mutasyonların büyük kısmı RNaz IIIb domaininde meydana gelmektedir ve bu mutasyonlar pri-miRNA işlenme sürecinde Drosha'nın fonksiyonunu etkilemektedir. Aynı zamanda Drosha geninde birçok missense mutasyon ve splayz bölge mutasyonlarına rastlanılmış ve ovaryum kanseri ile ilişkilendirilmiştir [182]. Drosha ekspresyonu, tümör progresyonu ve bireylerin hayatta kalmasının öngörülmesi açısından çeşitli malignensilerde araştırılmış ve bu genin ekspresyonunun dereğüle olduğu kanserde ortaya konmuştur. Örneğin, Drosha genindeki kopya sayısı artışı veya aşırı ekspresyonu ileri servikal skuamöz hücreli karsinomların %50'siden fazlasında görülmektedir. Lee ve arkadaşları (2003) Drosha geninin sessizleştirildiği hücrelerde öncü ve olgun miRNA sekanslarında azalma olduğunu göstermişlerdir. Bununla beraber Drosha ekspresyon düzeyinin birçok kanser tipinde arttığı rapor edilmiştir. Drosha ekspresyonunun artması, genel anlamda miRNA'ların ekspresyonunu artırır ve hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu teşvik eder. Diğer taraftan, Drosha ekspresyonunun birçok kanser türünde azaldığı bilinmektedir ve bu azalmanın

miRNA ekspresyonunu azalttığı ve buna ek olarak ta metastaz, invazyon ve bireylerin hayatta kalma süresinin azalmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir [183].

Yan ve arkadaşları (2011) 49 meme kanserli hastadan aldıkları kanserli dokularla normal dokular arasında Drosha ekspresyon düzeyini inceledikleri çalışmada, kanserli hücrelerin yarısından fazlasında Drosha mRNA'sının down-regüle olduğunu rapor etmiştir. Aynı zamanda örneklerin yaklaşık 3/4'ünden (%77,6) fazlasında Drosha ekspresyonunun azaldığını gözlemlenmiştir. Sonuç olarak Drosha geninin meme kanserinin oluşumunda görev alabileceğini ileri sürmüşlerdir [184]. Benzer şekilde Guo ve arkadaşları (2012), 24 nazofarenks karsinom dokusu ve 7 normal nazofarenks epitel dokusu ve nazofarenks karsinom hücre hatları ile yapmış oldukları çalışmada, kontrollere kıyasla hücre hatları ve karsinom dokularında Drosha gen ekspresyonunun azaldığını gözlemlemişler ve Nazofarenks karsinom hastalarında Drosha gen düzeyinin potansiyel prognostik biyomarkır olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ek olarak, Drosha ekspresyonundaki azalmanın, bu tip hastalarda sağkalım süresinin azalmasıyla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır [185]. Bu tip çalışmalar, Drosha fonksiyonunda meydana gelen bozuklukların miRNA ekspresyonu değişikliği ile tümör progresyonu ve prognozunu etkileyerek birçok kanser tipinde görüldüğünü ortaya koymaktadır. Drosha ekspresyonunun bazı kanser türlerinde artması ve bazılarında azalmasının nedeni tam olarak bilinmese de farklı kanser tiplerinin Drosha'yı kontrol eden genetik ve epigenetik mekanizmalarının farklı olduğu ve böylelikle bu ekspresyon değişiminin onkogenik ve tümör baskılayıcı miRNA'ların anormal ekspresyonuna neden olabileceği olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır.

Drosha ekspresyonunun azalmasının altında yatan nedenler tam olarak anlaşılmış değilse de çeşitli malignansilerde bu azalmanın olası nedenleri belirtilmiştir. Drosha ekspresyonu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede kontrol edilmektedir [186]. c-Myc onkogenin kodladığı transkripsiyon faktörü genomdaki genlerin yaklaşık olarak %10-15'ine bağlanır ve hem protein hem de kodlanmayan RNA'ları kodlayan genleri düzenler. Hücresel proliferasyon ve tümör oluşumunu düzenleyen c-Myc proteininin, transkripsiyonel düzeyde direkt olarak miRNA ekspresyonunu düzenlediği bilinmektedir. Dahası, miRNA'lar c-Myc hedef gen ağının önemli bileşenlerinden biri olarak tanımlanırlar.

Wang ve arkadaşları (2013) yapmış oldukları çalışmada, miRNA biyogenez yolağının en önemli bileşenlerinden biri olan Drosha'nın c-Myc hedef geni olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada c-Myc transkripsiyon faktörünün direkt olarak Drosha promotoruna bağlandığı ve böylelikle Drosha'yı transkripsiyonel olarak düzenlediği ortaya konmuştur. Aynı zamanda Drosha miktarını kontrol ederek indirekt olarak pri-miRNA işleme kompleksini düzenlediği belirtilmiştir [187].

Drosha ekspresyonunu düzenleyen faktörlerden biri de *BRCA1* genidir. Bu gen, genomik stabilitenin korunmasında kritik rolleri olan bir tümör baskılayıcı gendir. Meme ve diğer

dokularda eksprese edilen BRCA1, hasarlı genomların tamirinde görev alır. Kawai ve arkadaşları (2012), in vivo ve in vitro çalışmalarda, BRCA1 geninin mikroişlemci kompleksinde yer alan Drosha, Dead-box RNA helikazları olan DDX5 (RNA helikaz p68) ve DDX17 (RNA helikaz p72) komponentleri ile etkileşime girdiği ve kanserle ilintili spesifik miRNA'ların Drosha aracılı işlenme sürecini hızlandırdığını göstermişlerdir. Ek olarak, BRCA1, spesifik miRNA'ların stem-loop yapısını tanıyarak DNA bağlanma domaini aracılığı ile direkt bağlanma özelliği gösterir ve böylelikle Drosha mikroişlemci kompleks elemanları aracılığı ile miRNA biyogenezini düzenler [188].

Benzer şekilde Kim ve arkadaşları (2014), TET protein ailesinin bir üyesi olan RNA/DNA bağlanma proteini Ewing Sarkoma (EWS)'nin Drosha ve miRNA'ların ekspresyonunu düzenlediğini rapor etmişlerdir. EWS proteini farklı DNA bağlanma domainleri içeren birçok transkripsiyon faktörü ile etkileşim gösterirler. EWS füzyon proteinleri veya CREB-bağlanma proteini (CRP) gibi EWS'nin etkileşim gösterdiği proteinler çoğu genin transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Bu çalışmada EWS proteininin Drosha-DGCR8 mikroişlemci kompleksinin bir üyesi olduğu ve EWS inaktivasyonu sonucu bazı miRNA'ların ekspresyonunda değişim olduğu rapor edilmiştir. Bunlardan miR-29b ve miR-18b'nin EWS eksikliği olan fare fibroblast hücrelerinde ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Özellikle Drosha'nın promotor bölgesinde EWS-DNA etkileşiminin artması, Drosha transkripsiyonunun düzenlenmesinde EWS'nin rolünü desteklemektedir. EWS eksikliği olan fibroblast hücrelerde Drosha ekspresyonunun artması, pri-miRNA'ların pre-miRNA'ya dönüşümünü kolay hale getirebileceği fikrini ileri sürmektedir [189]. Diğer taraftan, p68, p72, p53 ve SMAD proteinleri gibi mikroişlemci kompleksinin iyi karakterize edilmiş proteinlerinin Drosha ile direkt veya dolaylı olarak etkileşim göstererek miRNA biyogenezinin düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir. Örneğin; p68 ve p72 eksikliğinde miRNA popülasyonunun yaklaşık %35'inde azalma olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, miRNA'ların işlenmesinde bu iki faktörün Drosha'nın aktivitesini düzenlediği fikrini ileri sürmektedir. Alternatif olarak, çeşitli proteinlerle etkileşim halinde olan p68/p72 proteinin, birçok faktörün Drosha kompleksine katılmasında merkezi bir rol üstlenebileceği ortaya konmaktadır. Transkripsiyonel olarak genleri düzenleme özelliğine sahip olan tümör baskılayıcı p53, p68 aracılığı ile Drosha kompleksi ile etkileşime girerek kanser hücrelerinde DNA hasarına yanıtta bazı pri-miRNA'ların olgunlaşmasını kolaylaştırır. p53'ün aksine bazı Drosha kofaktör proteinleri RNA bağlanma aktiviteleri göstererek direkt miRNA prekürsörleri ile etkileşime girerler. Heterojen nükleer ribonükleoprotein A1 (hnRNP) RNA tanıma motifi aracılığı ile miR-17-92 ailesinin bir üyesi olan miR-18a'nın olgunlaşmasına aracılık eder. hnRNP proteini gibi KH-tip splayzing regülatör proteini (KSRP), bazı miRNA prekürsörlerinin terminal ucuna bağlanır ve Drosha ile etkileşime girerek miRNA'ların olgunlaşmasına aracılık eder [190]. Mikroişlemci kompleksinde yer alan bu yardımcı proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen ekspresyon

değişimlerinin çeşitli kanserlerin patogeneğinde rol oynayabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur.

Çalışmamızda Drosha ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla hasta grubumuzda düşük olduğunu ve istatistiksel olarak bu değişimin anlamlı olduğunu gözlemledik. MDS-kontrol ve AML-kontrol kıyaslamasında yine hasta grubunda Drosha gen ekspresyonunun kontrole oranla düşük olduğu görüldü. AML-MDS grupları arasında ise Drosha gen ekspresyon düzeyi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Sonuç olarak, Drosha ekspresyonundaki azalmanın olgun miRNA'ların azalmasına yol açarak MDS, AML gibi miyeloid hematolojik malignansilerin oluşumuna aracılık edebilir. Drosha ekspresyonunun azalmasındaki neden tam olarak bilinmese de mikroşlemci kompleksinde yer alan yardımcı proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerin bu azalmaya neden olabileceği ileri sürülebilir. Aynı zamanda c-myc, EWS, p68, p72, p53 ve SMAD gen ekspresyon düzeylerinin hasta grubumuzda belirlenmesinin, Drosha gen ekspresyonundaki düşüşün nedeninin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Dicer, RNaz III endonükleaz ailesinin korunmuş bir üyesidir ve pre-miRNA'ların miRNA'lara dönüşümünde görev alan kritik bir enzimdir [191]. Dicer geni insanlarda 14q32'de lokalizedir. Bitki, zebra balığı ve fare üzerinde yapılan genetik çalışmalar, bu genin normal gelişim için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Örneğin, farelerde Dicer gen delesyonu, embriyo gelişiminin 6-7. gününde Oct-4 pozitif pluripotent embriyonik kök hücre havuzunun azalması nedeniyle erken embriyonik ölüme yol açmaktadır. Dicer gen eksikliği olan embriyonik kök hücreler, saç tokası yapısındaki miRNA'ları veya çift zincirli RNA'ları işleme görevini yerine getirememektedir. Dicer gen eksikliği olan ve olmayan embriyonik kök hücrelerdeki küçük RNA'ların sekans analizi, bu tür hücrelerde Dicer geninin tek katalitik fonksiyonunun miRNA biyogenezi olduğunu göstermiştir [192].

Farklı lösemi tiplerini de içeren kanserler, global miRNA ekspresyonundaki azalma ile karakterizedir. Hücrel transformasyon ve tümörogeneşte global miRNA down regülasyonu ile ilgili ilk çalışma akciğer kanserli K-Ras indüklü fare modellerinde gösterilmiştir. Dicer delesyonunun miRNA oluşumunu engelleyerek tümör oluşumunu hızlandırdığı saptanmıştır. miRNA ekspresyonunun değişiminin altında yatan neden veya nedenler hala tam olarak belirlenebilmiş değildir. Bu konuda ileri sürülen görüşlerden biri, Dicer genindeki mutasyonları takiben miRNA biyogenezindeki defekt sonucu miRNA'ların susturulması olabilir. Örneğin Kanser Genom Atlasından alınan veriler, akciğer, melanom ve ovaryum kanseri gibi çeşitli kanser tiplerinde Dicer geninin mutasyona uğradığını göstermektedir. Dahası, Dicer geninin kromozom 14 (14q32.13)'te subtelomerik bölgenin lokalizasyonuna bağlı olarak endometriyal kanser, akciğer kanseri, primer nöroblastoma, AML, KML ve lenfoma gibi çeşitli tümörlerde allelik delesyondan etkilendiği bulunmuştur. Örneğin, Fujino ve arkadaşları, endometrium kanserinin

yüksek bir yüzdesinde kromozom 14q'da heterozigotluk kaybı olduğunu ve bu çeşit tümörlerde minimal delesyon alanı olduğunu belirlemişlerdir. Bir diğer hipotez, Pampalakis ve arkadaşları tarafından ileri sürülen, Dicer geninin ilk ekzonda çokça yer alan CpG adacıklarının varlığına bağlı olarak DNA metlasyon mekanizmasıdır. Diğer bir deyişle, Dicer miRNA aracılı düzenlenmenin bir hedefidir. Örnek olarak, miR-16, Dicer ekspresyonunu inhibe ederek tüm miRNA'ların üretiminde negatif bir feed-back döngüsü gösterir. 13q14 hemizigot delesyonuna sahip hastalarda miR-15a ve miR-16-1 down regülasyonu gözlenir. miR-15a ve miR-16-1 ekspresyonunun eksikliği, del(13)(q14) karyotipine sahip KLL hastalarında Dicer gen ekspresyonunun aşırı artışına neden olabilmektedir. Ek olarak, Boren ve arkadaşları, miR-103, miR-107 ve let-7c up regülasyonlarının Dicer mRNA'sının 3'UTR bölgesiyle ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Son olarak öne sürülen hipotez ise p53 değişimleridir. p53 genindeki değişimler başta KLL olmak üzere çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, p53, p63 ve p73 Dicer gibi miRNA biyogenez bileşenlerinin düzenlenmesinde yer aldığını ileri sürmüştür. p53 mutasyonlu KLL hastalarında Dicer ekspresyonu wild-tip p53 genine sahip hastalara oranla daha düşüktür. Dicer geninin promotor bölgesinin p53-yanıt elementler içerdiğinin keşfedilmesini takiben, Dicer'ın p53'ün transkripsiyonel hedefi olabileceği ve p53'ün Dicer ekspresyonunu düzenlemesi, bu genin tümör baskılayıcı özelliğinden kaynaklı olabilmektedir. Bu nedenle Dicer genindeki genetik değişimler, lokasyonu ve post-translasyonel ve epigenetik mekanizmalar gibi diğer mekanizmalar, miRNA ekspresyon düzeyini değiştirebilen ve çeşitli kanserlerin oluşumuna neden olabilen faktörlerdir. Son olarak, miRNA ekspresyon değişimine neden olan faktör, Dicer gen ekspresyonundaki değişimlerdir. Bu genin ekspresyon düzeyindeki değişimler çeşitli kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir [192,193].

Zhang ve arkadaşları (2015), 100 mesane karsinomlu ve 50 normal mesane dokusunda Dicer gen ekspresyon düzeyini analiz ettikleri çalışmada, gerek Dicer proteinin gerekse mRNA düzeyinin normal dokulara kıyasla karsinomlu dokularda yüksek düzeyde eksprese olduklarını göstermişlerdir. Ek olarak, bu durumu ileri tümör evresi ile ilişkilendirmişlerdir. Sonuç olarak, bu genin ekspresyon düzeyindeki artışın mesane kanser oluşumuna aracılık ettiğini ve kötü prognozla ilintili olabileceği fikrini ileri sürmüşlerdir [194].

Faber ve arkadaşları (2010), 237 kolorektal kanserli hastalardan alınan tümör materyalinde Dicer gen ekspresyon düzeyinin yüksek olduğunu rapor etmiş ve bu durumu tümör evresi ve yaşam süresinin azalmasıyla ilişkilendirmiştir [195]. Periferik akciğer adenokarsinomu atipik adenomatöz hiperplazi ve bronşiyal karsinoma olarak adlandırılan noninvazif prekürsör lezyonlardan kaynaklanmaktadır. Chiosea ve arkadaşları (2007), 110 akciğer adenokarsinomlu dokularda miRNA biyogenez yolağının kilit elemanı olan Dicer gen ekspresyonunun rolünü araştırdıkları çalışmada, her iki prekürsör lezyon tipinde Dicer gen ekspresyonunun arttığını

göstermişlerdir. Dicer gen ekspresyonundaki artışın, periferal adenokarsinom gelişiminin başlangıç fazında gerçekleşebileceğini ileri sürmüşlerdir [196].

Olgun endojen miRNA'ların oluşumunda Dicer geninin önemli fonksiyonlar gördüğü bir dizi olaylar kaskadı gerekmektedir. Örneğin, Lee ve arkadaşları Dicer geninin susturulduğu hücrelerde prekürsör ve olgun miRNA sayısının azaldığını göstermiştir. Berstein ve arkadaşları ise farelerde Dicer gen eksikliğinin embriyonik kök hücre farklılaşmasını bozduğu ve gelişimin erken evrelerinde ölüme yol açtığını rapor etmişlerdir. Aynı zamanda düşük seviyedeki Dicer gen ekspresyonu normal hücre gelişim ve immün yanıtı etkilemektedir [193].

Torres ve arkadaşları (2011), endometriyum kanserinde Dicer gen ekspresyon düzeyini araştırmışlardır. Bu çalışmada, endometriyum kanser tanısı konmuş 26 birey hasta grubunu oluştururken, endometriyum orjin haricinde iyi huylu rahim kanseri olan 18 birey de kontrol grubunu oluşturmuştur ve bu bireylerden toplanan doku örneklerinde Dicer gen ekspresyonunu analiz etmişlerdir. Dicer gen ekspresyonu kontrol grubuna oranla hasta grubunda daha düşük düzeyde bulunmuştur ($p=0,009$). Sonuç olarak bu çalışmada, miRNA oluşum yolağının başlıca düzenleyici faktörlerinden biri olan Dicer geninin ekspresyon düzeyindeki değişimlerin endometrium kanserli olgularda miRNA profillerinin değişiminde görev alabileceği ileri sürülmüştür [197].

Karube ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada akciğer kanserli bireylerde Dicer ekspresyonunda azalma olduğunu rapor etmişlerdir. 67 küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalardan alınan doku örneklerini evrelendirmişler ve özellikle hastalığın ilerlemesinde Dicer'in prognostik bir öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda Karube ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, hem in vivo hem de in vitro da akciğer kanserinde let-7 mRNA'sının ekspresyon düzeyinin azaldığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dicer ekspresyonundaki azalma ile let-7a-1 ve let-7f-1 ekspresyonlarındaki azalma arasında önemli bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. miRNA'ların tüm olgun formlarının işlenme ve oluşumunda Dicer enziminin gerekli olduğu göz önünde bulundurulursa, Dicer ekspresyonundaki azalmanın kanser hücrelerinde muhtemelen diğer miRNA'ların ve let-7 ekspresyonunu azaltacak alternatif bir post-transkripsiyonel mekanizma oluşturabileceği fikri düşünülebilir [198].

Zhu ve arkadaşları (2012), 165 primer KLL hastaları ve 10 sağlıklı donörden alınan kemik iliği örneklerinde Dicer gen ekspresyon düzeyini belirledikleri çalışmalarında, kontrol grubuna kıyasla KLL hastalarında Dicer gen ekspresyon düzeyinin azaldığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda bu gen ekspresyonunun yaşam süresinin azalması ile kuvvetli bir şekilde korrelasyon gösterdiği saptanmıştır [193].

Çalışmamızda, miyeloid hematolojik malignansilerde Dicer gen ekspresyonunun kontrole kıyasla toplam hasta grubunda düşük düzeyde eksprese olduğunu gözlemledik. Benzer şekilde AML ve MDS hasta gruplarını kontrollerle kıyasladığımızda Dicer gen ekspresyonunun hastalarda

azaldığını ve istatistiksel olarak bu azalmanın anlamlı olduğunu gözlemledik. AML ve MDS hasta gruplarında ise anlamlı bir farklılık görülmedi. Dicer, normal hematopoezin farklı basamaklarında görevi olan önemli bir faktördür. Miyelopoezin erken gelişim basamaklarında farklı görevleri vardır. Miyeloid hücre hatlarının oluşumunda kök hücre hatlarını kontrol eden bir bileşendir. Aynı zamanda Dicer genindeki genetik ve epigenetik değişimler, fonksiyonel kök hücrelerin sayısında azalmaya yol açar ve hızlı bir şekilde apoptozu indükleyerek sonucunda hematopoez işleyişinde aksaklıklara neden olur. Bu bilgiler ışığında, Dicer gen ekspresyonunda meydana gelen azalmanın AML ve MDS gibi miyeloid hematolojik malignansilerin oluşumuna yol açabileceği düşünülebilir. miR-17/20/93/106 ve miR-223 gibi bazı miRNA'lar, olgun ve olgun olmayan miyeloid hücrelerde iyi tanımlanmış olsa da miyelopoezin farklı basamaklarında yer alan miRNA kontrol yolları hala tam olarak anlaşılmış değildir. Bu nedenle Dicer eksikliği olan fare modellerinde doku veya gelişimsel basamaklara spesifik miRNA'ların eklenip çıkarılması miRNA'ların hematopoez üzerindeki aktivitelerinin anlaşılmasında yardımcı olabilir. Aynı zamanda Dicer ekspresyonundaki azalma, pre-miRNA'nın miRNA'ya dönüşmemesi ve buna bağlı olarak hematopoietik miRNA'larda işlev eksikliği oluşturmaları, miyeloid öncü hücrelerin farklılaşması sırasında aksamalara neden olabilir.

TARBP2, miRNA işleme ve olgunlaşma sürecinde rol alan çift zincirli RNA bağlama proteinidir. Kromozom 12q13.13'de lokalize olan TARBP2 geninin kodladığı TARBP2 (TRBP) proteini, Dicer'in fonksiyonel partneridir ve küçük RNA'ların RISC kompleksine katılımında Dicer proteinine aracılık etmektedir [199]. pre-miRNA'lar sitoplazmaya geçtikten sonra Dicer-TRBP kompleksi tarafından tanınır ve 22 nt uzunluğunda olgun miRNA dubleksleri oluşur. dsRBD3 domaini aracılığıyla Dicer proteinin DEXH ve helikaz domainleri arasındaki bölgeyle etkileşime girer. Bu etkileşimin Dicer proteinini stabilize ettiği ve TARBP2 eksikliği miRNA ekspresyonunda azalma görüldüğü rapor edilmiştir [200]. TARBP2 geni, viral HIV-1 ekspresyonu, mikrosatellit instabilitesi, kanser kök hücre özellikleri ve tümör gelişimi gibi çeşitli patolojik ve biyolojik koşullarda önemli görevler üstlenmektedir. Kanserde TRBP fonksiyonunun bozulduğuna dair birçok çalışma yer almaktadır. Mikrosatellit instabilitesi gösteren kolon tümörlerinde çerçeve kayması mutasyonların oluşumu, Dicer ve olgun miRNA düzeyinde azalmaya yol açmaktadır. TRBP ekspresyonunun RNAi aracılı down-regülasyonu, Dicer proteininin destabilizasyonuna, dolayısıyla miRNA biyogenezinde aksaklıklara yola açmaktadır. Trunkat TARBP2 eksprese eden hücre hatlarında wild-tip TARBP2 geninin onarımı, normal düzeylerde Dicer ve olgun miRNA oluşumunu sağlamaktadır [201]. TARBP2 ekspresyon düzeyi, çeşitli kanser hücre hatlarında değişkenlik göstermekte ve bu kanser hücrelerinde farklı roller üstlenmektedir. Literatürde prostat, kutanöz malin melanom ve adenokortikal karsinom gibi bazı kanser türleriyle ilişkilendirilmiştir [202].

Caramuta ve ark (2013), 73 adenokortikal tümör (43 adenom ve 30 karsinom) ve 9 normal adrenal korteks üzerinde TARBP2 gen ekspresyon düzeyini analiz ettikleri çalışmalarında, bu genin ekspresyon düzeyinin adenom veya adrenal kortekslere kıyasla karsinomlarda daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. TARBP2 ekspresyonunun adenom ve karsinomları ayırmada önemli bir belirteç olduğunu belirlemişlerdir. Aynı zamanda NCI-H295R hücre hatlarında TARBP2 gen ekspresyonunun baskılanması, hücre büyümesi ve apoptozu etkileyebilir. Çalışmada, TARBP2'nin in vivo ve in vitro olarak hücre büyümesi ve transformasyonunu indüklediği ve dolayısıyla adenokortikal karsinomlarda onkojenik fonksiyonu olabileceği ileri sürülmüştür. TARBP2 gen ekspresyonundaki artışın, karsinomların %57'sindeki kopya sayısındaki artıştan kaynaklanabileceği iddia edilmiştir. Son olarak, miR-195 ve miR-497'nin bu kanser türünde direkt olarak TARBP2 ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermişlerdir [203].

Lin ve arkadaşları (2014), TARBP2 ekspresyon düzeyinin normal dokulara kıyasla meme karsinomlu dokularda yüksek düzeyde eksprese olduklarını ortaya koymuşlardır. Dahası, triple negatif meme kanseri ve evre 3 meme kanseri ile pozitif olarak ilintili olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, TARBP2 ekspresyon düzeyinin triple negatif meme kanseri olmayan ve onlara komşu normal meme kanseri dokularına oranla triple negatif meme kanserli dokuda aşırı ekprese olduğu ortaya konmuştur. İlave olarak, meme kanserinde prognostik bir faktör olabileceği ileri sürülmektedir [204]. Literatürde bu gen ekspresyonundaki azalma ile kanser arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma sayısı oldukça sınırlıdır [202].

Vito ve ark. (2012), çalışmalarında Ewing sarkoma ailesi tümörlerinde kanser kök hücrelerin, çeşitli kanser tiplerinde embriyonik kök hücreler ve kanser kök hücrelerin paylaştığı geniş aralıktaki miRNA'ları baskıladıklarını göstermişlerdir. Ek olarak, bu kanser kök hücreleri düşük düzeyde TARBP2 ekspresyonu olduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle, miRNA'ların azalması, TARBP2 aracılı miRNA oluşumundaki aksaklıktan kaynaklanmaktaydı. Dahası, TARBP2 genindeki ekspresyonundaki bozukluğun onarımı, in vivo farelerdeki koloni oluşumu ve tümör büyümesini inhibe etmektedir. Bu durum göz önüne alındığında kanser kök hücrelerinde tümör oluşumu ve kendini yenilemesinde TARBP2-bağımlı miRNA ekspresyonunda meydana gelen aksaklıkların rolü olduğu rapor edilmiştir. Kolorektal ve gastrik kanserlerde de TARBP2 gen ekspresyonundaki azalma olduğu ortaya konmuş ama bu azalmanın gende meydana gelen mutasyonlar sonucu oluştuğu gösterilmiştir [205].

Çalışmamızda, TARBP2 gen ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla 1.4 kat azalma gösterdiğini ve istatistiksel olarak bu değişimin anlamlı olduğunu belirledik. TARBP2 bağımlı miRNA olgunlaşmasının normal hücrelerin gelişimi açısından gerekli olduğu savından yola çıkarak, bu genin ekspresyon düzeyindeki azalmanın direkt olarak Dicer genini etkileyerek doğru miRNA dublekslerinin oluşumunu engellemesi ve ilaveten olgun miRNA sayısında azalmaya yol

açması nedeniyle kanser oluşumuna aracılık ettiği düşünülebilir. MDS-kontrol karşılaştırılmasında TARBP2 ekspresyonu hastalarda azalma gösterdi. AML-kontrol grupları arasında bu genin ekspresyon düzeyi bakımından anlamlı bir farklılık saptanmadı. AML ve MDS hasta grupları arasında TARBP2 gen ekspresyonu bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptandı. TARBP2 genindeki değişimin MDS'den AML'ye dönüşüm mekanizmasının açığa çıkarılmasında biyobelirteç olabileceği kanısındayız.

Küçük düzenleyici RNA'lar aracılığıyla gen düzenlenmesi, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen düzenleyici mekanizmalar tarafından gerçekleşir. Küçük, kodlanmayan RNA aracılı transkripsiyonel gen sessizleştirilmesinde, mitolojide Yunan savaşçıları anlamına gelen Argounate protein ailesi kilit rol oynamaktadır. RISC kompleksinin katalitik bileşenleri olan AGO proteinleri, siRNA, miRNA ve piRNA'ları da kapsayan birçok küçük kodlanmayan RNA'lara bağlanma özelliği gösterirler [206].

AGO1, RISC kompleksinin major komponentlerinden biridir ve memelilerde iyi çalışılmış bir proteindir. Bu protein, neredeyse tüm dokularda eksprese edilmekte ve nukleusta bulunmaktadır. Sineklerde hücre siklusunun kontrolünde AGO1'in düzenleyici bir rolü olduğu gösterilmiştir. Hücre siklusunda G2/M geçişinde görev alan siklin B ile etkileşim göstermektedir. Mitotik bölünme aşamasında, gelişimin erken evrelerinde doğru kromozom segregasyonunda kritik bir faktördür. Embriyogenez aşamasında bu gende meydana gelen mutasyon, siklin bağımlı kinazlarda aktivasyon artışına yol açarken, bazı hücre siklusu kontrol proteinlerinin aktivitesinde azalmaya yol açar. miRNA fonksiyonu üzerindeki rolleri dikkate alındığında AGO proteinlerinin ekspresyon düzeyinde meydana gelen değişimlerin çeşitli kanserlerle ilişkilendirilmesi beklenmedik bir durum değildir. Çalışmalar, diğer miRNA biyogenez elemanları gibi AGO1 geninin de kanser oluşumu ve ilerlemesinde rol alabileceğini ortaya koymuştur [207].

Wang ve ark. (2018), hepatoselüler kanser hücrelerinde AGO1 genindeki baskılanmanın, bu hücrelerde migrasyon ve invazyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir. AGO1 gen eksikliğinin, tümör progresyonu ile ilişkili olan hücre proliferasyonunun inhibisyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Bu çalışma, hepatoselüler karsinom hücrelerinde AGO1 up-regülasyonunun malign fenotip ve metastazla ilintili olabileceğini ileri sürmektedir. Epitel-mezenşimal transisyonu (EMT) karsinogenezin major mekanizmalarından biridir. EMT prosesini manipüle eden önemli bir sinyal yolağı olan TGF- β yolağı, MAP kinaz proteinleri ve Smad proteinlerini içerir. Aynı çalışmada, TGF- β yolağında yer alan ERK1/2, p38, Smad2 ve Smad4 ekspresyonu ve fosforilasyonu araştırılmış ve AGO1'in p38 haricindeki 3 proteinin aktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Sonuç olarak AGO1, TGF- β yolağındaki proteinleri aktive ederek özellikle Smad4'ün hücre nukleusuna transferini teşvik etmiştir. Smad4, EMT sürecindeki önemli transkripsiyonel faktörü olan Snail'in ekspresyonunu artırarak hepatoselüler karsinom hücrelerindeki metastaz ve tümör büyümesini hızlandırmıştır [208].

Parisi ve arkadaşları (2011), nöroblastoma hücre hatlarında AGO1 gen ekspresyonunun yüksek olduğunu belirlemişlerdir. AGO1 aşırı ekspresyonu, G1/S geçişindeki gecikme nedeniyle hücre döngüsünün yavaşlamasına yol açar. İlaveten, UV ışığına maruziyete yanıtta, hücresel motilite ve invazyonu azaltmakta ve apoptozu indüklemektedir. AGO1 aşırı ekspresyonu tümör baskılayıcı bir faktör olarak görev almaktadır [209].

AGO proteinleri sitopazmada gen ekspresyonu üzerindeki pleiotropik etkisini miRNA'ları kullanarak çoklu transkriptlerin susturulması şeklinde çeşitli hücresel süreçleri düzenleyerek ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, nükleer AGO1'de birçok genin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Huang ve arkadaşları (2013), prostat adenokarsinom hücre hatlarında onkojenik yolda yer alan genlerin ekspresyonunu düzenlediği ve böylelikle kanser fenotipinin oluşumuna aracılık edebileceği fikrini ortaya atmışlardır. Diğer bir ifadeyle AGO1 ekspresyonunun baskılanması, kanser hücrelerinin progresyonunu ve sağkalımını azaltabilir [206].

Voller ve arkadaşları (2016), AGO1 gen ekspresyonunun diğer tümör hücre hatları ve normal dokulara kıyasla melanom kökenli hücre hatlarında yüksek olduğunu rapor etmiştir. miRNA olgunlaşma sürecinde zincir seçimi ve miRNA'nın hedef mRNA'ya iletilmesinde rol alan AGO1 genindeki bu ekspresyon değişimi, birçok hücresel süreç üzerinde etkisi bulunmaktadır. Özellikle tümör gelişimi ve ilerlemesi üzerine major etki göstermektedir [210].

Çalışmamızda, kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda AGO1 gen ekspresyon düzeyinde anlamlı bir şekilde azalma olduğunu gözlemledik. Bu azalma, miRNA disregülasyonuna aracılık edebilir. miRNA'ların onkojenik ve tümör baskılayıcı özellikleri göz önünde bulundurulursa ve miyeloid hücre farklılaşmasındaki rolleri düşünüldüğünde, AGO1 ekspresyonundaki azalma, miyeloid hücre farklılaşmasını bozabilir ve AML, MDS oluşumuna aracılık edebilir. Aynı zamanda p53 düzeyi ile AGO1 ekspresyon düzeyi ile ters korrelasyon gösterebilmektedir. Bu hastalarda p53 düzeyi de AGO1 ekspresyon düzeyindeki azalmaya yol açmış olabilir. Ek olarak, AGO1 ekspresyonundaki azalma, siklin-bağımlı kinazlar gibi hücre siklusu kontrol noktalarında görevli proteinlerin azalması veya artmasına neden olarak bu malignansilerde kontrolsüz hücre çoğalmasını tetikleyebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA aracılı gen düzenlenmesindeki aksaklıkların hücresel proliferasyon veya transformasyon programının bir parçası olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle DNA hasarı esnasında miRNA olgunlaşmasının hızlanması ve kanserde yaygın olarak azalmaları bu bulguyu destekler niteliktedir. miRNA aracılı gen ekspresyonundaki değişimler kanser hücrelerinin genel özellikleri olabilir ve bu düzenleyici mekanizma tümör baskılanmasında kilit rol oynayabilir. Dolayısıyla, miRNA'lar ve kanserlerle ilgili yapılan çalışmalar neticesinde, Dicer, TARBP2, Drosha, XPO5, DGCR8, AGO1-2 gibi miRNA biyogenez

yolağında rol alan genlerin kanserlerde tümör baskılayıcı özelliğe sahip olduklarına ilişkin görüşler ağırlık kazanmaya başlamıştır [211].



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışma sonucunda, *Drosha*, *DGCR8*, *Dicer*, *AGO1* ve *TARBP2* genlerinin ekspresyon düzeyleri açısından kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). *Dicer*, *Drosha*, *AGO1* ve *TARBP2* genlerinin ekspresyonları hasta grubunda azalırken, *DGCR8* geninin ekspresyon düzeyi ise hasta grubunda daha yüksek olarak gözlemlendi. Çalışmamız, bu genlerdeki olası ekspresyon değişimlerinin pre-miRNA veya olgun miRNA oluşumunu engelleyerek AML ve MDS oluşumuna aracılık edebileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır.
- İlgili genlerin ekspresyon düzeyleri, MDS- kontrol, AML-kontrol ve MDS-AML hasta grupları arasında da ayrı ayrı analiz edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirme neticesinde MDS hastalarında *DGCR8* geninde ekspresyon düzeyinde artış görülürken diğer genlerin ekspresyon düzeylerinin daha az olduğu gözlemlendi. AML hasta grubunda da benzer sonuçlar gözlemlenirken, AML-MDS hasta grubunda *TARBP2* ekspresyon düzeyinin AML hastalarında yüksek olduğu saptandı.
- Bu çalışma sonucundan elde edilen bilgiler, AML ve MDS gibi miyeloid hematolojik malignansilerin oluşumuna aracılık eden moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına, olası biyobelirteçlerin sayısının artırılmasına, erken tanı ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik katkısının yanında yeni çalışmaların geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.
- Bu çalışmanın devamında daha geniş örneklem büyüklüğü ile çalışmak önemlidir.
- MDS ve AML'nin alt tiplerine ayrılarak ve risk durumu belirlenerek ilgili genlerin ekspresyon durumunun belirlenmesi, tedaviye yanıtta umut vaat edici olabilir.
- *AGO2* ve *XPO5* genlerinin ekspresyon düzeyleri hasta ve kontrol grupları arasında değerlendirilemedi. Bu genlerin hasta grubumuzda düşük düzeyde eksprese edildiğini düşünmekteyiz. Bu alanda yapılacak başka çalışmalarla daha net ve sağlıklı sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1]. Hamid, G.A., The Pattern of Hematological Malignancies at Al-Gamhouria Teaching Hospital, Aden, Yemen, from 2008 to 2010. *Turk J Hematol* **2012**, 29, 342-347.
- [2]. Smith, A.; Howell, D.; Patmore, R.; Jack, A.; Roman, E., Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *British Journal of Cancer* **2011**, 105, 1684 – 1692.
- [3]. Wang, X.X.; Zhang, R.; Li, Y., Expression of the miR-148/152 Family in Acute Myeloid Leukemia and its Clinical Significance. *Med Sci Monit* **2017**, 23, 4768-4778.
- [4]. Tomic, N.; Petrovic, I.; Grujicic, N.K.; Davidovic, S.; Virijevic, M.; Vukovic, N.S.; Pavlovic, S.; Stevanovic, M., Prognostic significance of SOX2, SOX3, SOX11, SOX14 and SOX18 gene expression in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia Research* **2018**, 67, 32–38.
- [5]. Fuchs, O., Treatment of Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia by Immunomodulatory and Epigenetic Drugs. *Intech* **2013**, 157-193.
- [6]. Fabbri, M.; Garzon, R.; Andreeff, M.; Kantarjian, H.M.; Maneroand, G.G.; Calin, G.A., MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications. *Leukemia* **2008**, 22, 1095–1105.
- [7]. Kluiver, J.; Kroesen, B.J.; Poppema, S. and Aberg, A.V., The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* **2006**, 20, 1931–1936.
- [8]. Huang, J.T.; Wang, J.; Srivastava, V.; Sen, S. and Liu, S.M., MicroRNA machinery genes as novel biomarkers for cancer. *Frontiers in Oncology* **2014**, 113, (4), 1-9.
- [9]. Winter, J.; Jung, S.; Keller, S.; Gregory, R.I.; Diederichs, S., Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Bio* **2005**, 7, (7), 643-645.
- [10]. Bryder, D.; Rossi, D.J.; Weissman, I.L., Hematopoietic Stem Cells. *The American Journal of Pathology* **2006**, 169, (2), 338-346.
- [11]. Seita, J.; Weissman, I.L., Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *WIREs Syst Biol Med* **2010**, 2, 640–653.
- [12]. Blank, U.; Karlsson, G.; Karlsson, S., Signaling pathways governing stem-cell fate. *The American Society of Hematology* **2008**, 111, (2), 492-503.
- [13]. Cabrita, G.J.M.; Ferreira, B.S.; Silva, C.L.; Gonçalves, R.; Almeida-Porada, G.; Cabral, J.S.M., Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *Trends in Biotechnology* **2003**, 21, (5), 223-240.
- [14]. Passegue, E.; Jamieson, C.H.M.; Ailles, L.E.; Weissman, I.L., Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Pnas* **2003**, 100, (1), 11842–11849.
- [15]. Fernández, K.S.; Alarcón, P.A., Development of the Hematopoietic System and Disorders of Hematopoiesis that Present During Infancy and Early Childhood. *Pediatr Clin N Am* **2013**, 60, 1273–1289.

- [16]. Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, 414, 105-111.
- [17]. Warr, M.R.; Pietras, E.M.; Passegue, E., Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wires Syst Biol Med* **2011**, 3, 681-701
- [18]. Li, Q.; Liu, L.; Li, W., Identification of circulating microRNAs as biomarkers in diagnosis of hematologic cancers: a meta-analysis. *Tumor Biol.* **2014**, 35, 10467-10478.
- [19]. Undi, R.B.; Kandi, R.; Gutti, R.K., MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators. *Advances in Hematology* **2013**, 1-20.
- [20]. Kelly, L.; Paul, M.D., Rehabilitation and Exercise Considerations in Hematologic Malignancies. *Am J Phys Med Rehabil* **2011**, 90, (5), 88-94.
- [21]. Hossain, M.S., et al., Diagnosed hematological malignancies in Bangladesh - a retrospective analysis of over 5000 cases from 10 specialized hospitals. *BMC Cancer* **2014**, 14, 438-445.
- [22]. Hassan, M.; Abedi-Valugerdi, M., Hematologic malignancies in elderly patients. *Haematologica* **2014**, 99, (7), 1124-1127.
- [23]. Murati, A.; Brecqueville, M.; Devillier, R.; Mozziconacci, M.J.; Gelsi-Boyer, V.; Birnbaum, D., Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* **2012**, 12, 304-319.
- [24]. Subtil, A., Myeloid Neoplasms. *Clin Lab Med* **2017**, 37, 575-585.
- [25]. Kobbe, G.; Schroeder, T.; Haas, R.; Germing, U., The current and future role of stem cells in myelodysplastic syndrome therapies. *Expert Review of Hematology* **2018**, 11, (5), 411-422.
- [26]. Zini, G., Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Ann Lab Med* **2017**, 37, 465-474.
- [27]. Liao, R.; Xu, Y.; Chen, M.; Chen, X.; Zhan, X.; Sun, J., Molecular mechanism of microRNA involvement in genesis of myelodysplastic syndrome and its transformation to acute myeloid leukemia. *Hematology* **2013**, 18, (4), 191-197.
- [28]. Li, J., Myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cell. *Int J Cancer* **2013**, 133, 525-533.
- [29]. Cole, P.; Sateren, W. and Delzell, E., Epidemiologic Perspectives on Myelodysplastic Syndromes and Leukemia. *Leukemia Research* **1995**, 19, (6), 361-365.
- [30]. Nimer, S.D., Myelodysplastic syndromes. *Blood* **2008**, 111, (10), 4841-4851.
- [31]. Bennett, J.M.; Steensma, D.P., The Myelodysplastic Syndromes: History and Classification. In: *Myelodysplastic Syndromes*. CRC Press, 2008; p. 13-37.
- [32]. Ghosh, A., Myelodysplastic syndrome: classification and changing concept. *Journal of Pathology of Nepal* **2011**, 1, 142-150.

- [33]. List, A., *Clinician's Manual on Myelodysplastic Syndromes*. 4th ed.; Current Medicine Group: New York, 2011; p 17-19.
- [34]. Várkonyi, J., *The Myelodysplastic Syndromes*. Springer Dordrecht Heidelberg: New York, 2011; p1-4.
- [35]. Zeidan, A.M., Faltas, B.; Smith, B.D.; Gore, S., Myelodysplastic syndromes: what do hospitalists need to know?. *Journal of hospital medicine* **2013**, 8, (6), 351-357.
- [36]. Sekeres, M.A., Epidemiology, natural history, and practice patterns of patients with myelodysplastic syndromes in 2010. *J Natl Compr Canc Netw* **2011**, 9, (1), 57-63.
- [37]. Rafael, B.; Steensma, D.P., Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2014**, 124, (18), 2793-2803.
- [38]. Bennett, J.M.; Komrokji, R.S., The myelodysplastic syndromes: diagnosis, molecular biology and risk assessment. *Hematology* **2005**, 10, (1), 258-269.
- [39]. Xiaomei, M.A., Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *The American journal of medicine* **2012**, 125, (7), 2-5.
- [40]. Cogle, C.R., Incidence and burden of the myelodysplastic syndromes. *Current hematologic malignancy reports* **2015**, 10, (3), 272-281.
- [41]. Troy, J.D.; Atallah, E.; Geyer, J.T.; Saber, W., Myelodysplastic syndromes in the United States: an update for clinicians. *Annals of medicine* **2014**, 46, (5), 283-289.
- [42]. Gangat, N.; Patnaik, M.M.; Tefferi, A., Myelodysplastic syndromes: contemporary review and how we treat. *American journal of hematology* **2016**, 91, (1), 76-89.
- [43]. Vardiman, J., The classification of MDS: from FAB to WHO and beyond. *Leukemia research* **2012**, 36, (12), 1453-1458.
- [44]. Giagounidis, A.; Haase, D., Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2013**, 26, (4), 337-353.
- [45]. Sandler, S., Current and Proposed Classification Criterion and Prognostic Models for the Myelodysplastic Syndromes and Dysplastic Cytopenias of Undetermined Significance. *Ann Hematol Oncol* **2016**, 3, (3), 1084.
- [46]. Hong, M.; He, G., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myelodysplastic syndromes. *J Transl Int Med* **2017**, 5, (3), 139-143.
- [47]. Liew, E., Owen, C., Familial myelodysplastic syndromes: a review of the literature. *Haematologica* **2011**, 96, (10), 1536-1542.
- [48]. Pellagatti, A., et al., Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia* **2010**, 24, (4), 756-64.
- [49]. Macedo, L.C., et al., Genetics factors associated with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **2015**, 55, (1), 76-81.
- [50]. Jhanwar, S.C., Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview. *Advances in biological regulation* **2015**, 58, 28-37.

- [51]. Nolte, F.; Hofmann, W.K., Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Annals of hematology* **2008**, 87, (10), 777-795.
- [52]. Heinrichs, S.; Berman, J.N.; Ortiz, T.M. et al., CD34+ cell selection is required to assess HOXA9 expression levels in patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* **2005**, 130, 83-86.
- [53]. Montalban-Bravo, G.; Garcia-Manero, G., Myelodysplastic syndromes: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* **2018**, 93, 129-147.
- [54]. Raza, A.; Galili, N., The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nature Reviews Cancer* **2012**, 12, 849-859.
- [55]. Ganguly, B.B.; Kadam, N.N., Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update up-to date. *Mutation Research* **2016**, 769, 47-62.
- [56]. Harada, H.; Harada, Y., Recent advances in myelodysplastic syndromes: Molecular pathogenesis and its implications for targeted therapies. *Cancer science* **2015**, 106, (4), 329-336.
- [57]. Walter, M.J., et al., Clonal diversity of recurrently mutated genes in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **2013**, 27, (6), 1275-1282.
- [58]. Makishima, H. et al., Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* **2012**, 119, (14), 3203-3210.
- [59]. Obeng, E.A., et al., Physiologic expression of SF3B1 K700E causes impaired erythropoiesis, aberrant splicing, and sensitivity to therapeutic spliceosome modulation. *Cancer Cell* **2016**, 30, (3), 404-417.
- [60]. Pellagatti, A.; Boultonwood, J., Splicing factor gene mutations in the myelodysplastic syndromes: impact on disease phenotype and therapeutic applications. *Advances in biological regulation* **2017**, 63, 59-70.
- [61]. Ogawa, S., Splicing factor mutations in myelodysplasia. *International journal of hematology* **2012**, 96, (4), 438-442.
- [62]. Zheng, X., et al. Prognostic value of SRSF2 mutations in patients with de novo myelodysplastic syndromes: A meta-analysis. *PloS one* **2017**, 12, (9), 1-12.
- [63]. Inoue, D.; Bradley, R.K.; Abdel-Wahab, O., Spliceosomal gene mutations in myelodysplasia: molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis. *Genes & development* **2016**, 30, (9), 989-1001.
- [64]. Kim, E., et al. SRSF2 mutations contribute to myelodysplasia by mutant-specific effects on exon recognition. *Cancer cell* **2015**, 27, (5), 617-630.
- [65]. Saez, B.; Walter, M.J.; Graubert, T.A., Splicing factor gene mutations in hematologic malignancies. *Blood* **2017**, 129, (10), 1260-1269.
- [66]. Yip, B. H., et al., The U2AF1 S34F mutation induces lineage-specific splicing alterations in myelodysplastic syndromes. *The Journal of clinical investigation* **2017**, 127, (6), 2206-2221.
- [67]. Ilagan, J.O., et al., U2AF1 mutations alter splice site recognition in hematological malignancies. *Genome research* **2015**, 25, (1), 14-26.

- [68]. Madan, V., et al., Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome. *Nature communications* **2015**, 6, 6042-6073.
- [69]. Papaemmanuil, E., et al., Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **2013**, 122, (22), 3616-3627.
- [70]. Abdel-Wahab, O.; Figueroa, M.E., Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *ASH Education Program Book* **2012**, (1), 56-64.
- [71]. Hirai, H., Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Japanese journal of clinical oncology* **2003**, 33, (4), 153-160.
- [72]. Fenaux P.; Mufti, G.J.; Hellstrom-Lindberg E., et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomized, open-label, phase III study. *Lancet Oncol.* **2009**, 10, (3), 223-232.
- [73]. Jankowska, A.M.; Szpurka, H.; Tiu, R.V.; Makishima, H.; Afable, M.; Huh, J.; O'Keefe, C.L; Ganetzky, R.; McDevitt, M.A.; Maciejewski, J.P., Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **2009**, 113, 6403-10.
- [74]. Shih, A.H.; Abdel-Wahab, O.; Patel, J.P.; Levine, R.L., The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12, 599-612.
- [75]. Tahiliani, M.; Koh, K.P; Shen, Y., et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **2009**, 324, 930-935.
- [76]. Dang, L.; White, D.W.; Gross, S., et al., Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **2009**, 462, (7274), 739-744.
- [77]. Ewalt, M., et al. DNMT3a mutations in high-risk myelodysplastic syndrome parallel those found in acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal* **2011**, 1, (3), 9-12.
- [78]. Ley, T.J.; Ding, L.; Walter, M.J., et al. DNMT3A Mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* **2010**, 363, (25), 2424-2433.
- [79]. Sperling, A.S.; Gibson, C. J.; Ebert, B. L., The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **2017**, 17, (1), 5-19.
- [80]. Sashida, G., et al., Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukaemic transformation. *Nature communications* **2014**, 5, 4177-4191.
- [81]. Cabrero, M., et al., Down-regulation of EZH2 expression in myelodysplastic syndromes. *Leukemia research* **2016**, 44, 1-7.
- [82]. Kroeze, L.I., et al. Genetic defects in PRC2 components other than EZH2 are not common in myeloid malignancies. *Blood* **2012**, 119, (5), 1318-1319.
- [83]. Abdel-Wahab, O.; Gao, J.; Adli, M., et al. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* **2013**, 210, 2641-59.

- [84]. Lindsley, R.C.; Ebert, B. L., Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2013**, 8, 21-47.
- [85]. Bejar, R.; Levine, R.; Ebert, Benjamin L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *Journal of clinical oncology* **2011**, 29, (5), 504-515.
- [86]. Hock, H.; Shimamura, A., ETV6 in hematopoiesis and leukemia predisposition. *Semin Hematol* **2017**, 54, (2), 98-104.
- [87]. Hock, H., et al. Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes & development* **2004**, 18, (19), 2336-2341.
- [88]. Haferlach, C., et al., ETV6 rearrangements are recurrent in myeloid malignancies and are frequently associated with other genetic events. *Genes, Chromosomes and Cancer* **2012**, 51, (4), 328-337.
- [89]. Schroeder, M.A.; Dezern, A.E., Do somatic mutations in de novo MDS predict for response to treatment?. *ASH Education Program Book* 2015, **2015**, (1), 317-328.
- [90]. Tsai, C.H., et al. Prognostic impacts and dynamic changes of cohesin complex gene mutations in de novo acute myeloid leukemia. *Blood cancer journal* **2017**, 7 (12), 663-670.
- [91]. Thota, S., et al., Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood* **2014**, 124, (11), 1790-1798.
- [92]. Solomon, D.A.; Kim, J.S.; Waldman, T., Cohesin gene mutations in tumorigenesis: from discovery to clinical significance. *BMB reports* **2014**, 47, (6), 299-310.
- [93]. Pellagatti, A.; Boulwood, J., The molecular pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *European journal of haematology* **2015**, 95, (1), 3-15.
- [94]. Epling-Burnette, P.K.; List, A.F., Advancements in the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndrome. *Current opinion in hematology* **2009**, 16, (2), 70-76.
- [95]. Bejar, R., et al., Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *New England Journal of Medicine* **2011**, 364, (26), 2496-2506.
- [96]. Steensma, David P. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* **2015**, 90(7):969-83.
- [97]. Garcia-Manero, G., Prognosis of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2010**, 1, 330-7.
- [98]. Kouides, P.A.; Bennett, J.M., Understanding the myelodysplastic syndromes. *The Oncologist* **1997**, 2, 6, 389-401.
- [99]. Matsuo, M., et al., Clinical features and prognosis of patients with myelodysplastic syndromes who were exposed to atomic bomb radiation in Nagasaki. *Cancer science* **2016**, 107, (10), 1484-1491.
- [100]. Haddad, A.; Maciejewski, J.P.; Kalaycio, M., Clinical significance of cytogenetics in myelodysplastic syndromes. *Laboratory Medicine* **2015**, 39, 6, 367-370.
- [101]. Foran, J.M.; Shammo, J.M., Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. *The American journal of medicine* **2012**, 125, (7), 6-13.

- [102]. Jädersten, M.; Hellström-Lindberg, E., Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *Journal of internal medicine* **2009**, 265, (3), 307-328.
- [103]. Saultz, J.N.; Garzon, R., Acute myeloid leukemia: a concise review. *Journal of clinical medicine* **2016**, 5, (3), 33-50.
- [104]. Uzunhan, T.A.; Karakaş, Z., Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Çocuk Dergisi*, **2012**, 12, (1), 6-15.
- [105]. Thomas, X., First contributors in the history of leukemia. *World* **2013**, 2, (3): 62-70.
- [106]. Sudhakar, A., History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy* **2009**, 1, (2), 1-4.
- [107]. Gaynon, P.S.; Zomorodian, T.J.; Pinkel D., History of leukemia: historical perspectives. *Childhood Leukemias* **2012**, 1-10.
- [108]. Rubnitz, J.E.; Gibson, B.; Smith, F.O., Acute myeloid leukemia. *Hematology/Oncology Clinics* **2010**, 24, (1), 35-63.
- [109]. Estey, E.; Dohner, H., Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* **2006**, 368, (9550), 1894-1907.
- [110]. Deschler, B.; Lübbert, M., Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer* **2006**, 107, (9), 2099-2107.
- [111]. Vardiman, J.W.; Harris, N.L.; Brunning, R.D., The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **2002**, 100, (7), 2292-2302.
- [112]. Ansell, S.M., Rare Hematological Malignancies. Springer Science & Business Media: New York, **2008**; p149.
- [113]. Abdul-Hamid, G., Classification of Acute Leukemia. In: *Acute Leukemia-The Scientist's Perspective and Challenge. InTech*, **2011**; p.3-18.
- [114]. Wang, M.L.; Bailey, N.G., Acute myeloid leukemia genetics: risk stratification and implications for therapy. *Archives of pathology & laboratory medicine* **2015**, 139, (10), 1215-1223.
- [115]. Takahashi, S., Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of hematology & oncology* **2011**, 4, (1), 36-47.
- [116]. Daugaard, I.; Hansen, T.B., Biogenesis and function of ago-associated RNAs. *Trends in Genetics* **2017**, 33, (3), 208-219.
- [117]. Kumar, A., et al. MicroRNA: biogenesis and computational target identification: a review. *Veterinary World* **2013**, 6, (10), 761-765.
- [118]. Melo, C.A.; Melo, S.A. Biogenesis and physiology of MicroRNAs. In: *Non-coding RNAs and Cancer*. Springer: New York, **2014**; p. 5-24.
- [119]. Xu, L.; Yang, B.; Al, J., MicroRNA transport: a new way in cell communication. *Journal of cellular physiology* **2013**, 228, (8), 1713-1719.

- [120]. Von Brandenstein, M.; Richter, Cl.; Fries, J.W.U., MicroRNAs: small but amazing, and their association with endothelin. *Life sciences* **2012**, 91, 475-489.
- [121]. Zhang, H.; Maniar, J.M.; Fire, A.Z., 'Inc-miRs': functional intron-interrupted miRNA genes. *Genes & development* **2011**, 25, (15), 1589-1594.
- [122]. Almeida, M.I.; Reis, R.M.; Calin, G.A., MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, 717, (1), 1-8.
- [123]. Lim, L.P., et al., The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development* **2003**, 17, (8), 991-1008.
- [124]. Wahid, Fazli, et al., MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* **2010**, 1803, (11), 1231-1243.
- [125]. Kim, V. N.; Nam, J., Genomics of microRNA. *Trends in Genetics* **2006**, 22, (3), 165-173.
- [126]. Ghorai, A.; Ghosh, U., miRNA gene counts in chromosomes vary widely in a species and biogenesis of miRNA largely depends on transcription or post-transcriptional processing of coding genes. *Frontiers in genetics* **2014**, 5, 100-111.
- [127]. Larrea, E., et al., New concepts in cancer biomarkers: circulating miRNAs in liquid biopsies. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17, (5), 627.
- [128]. Gurtan, A.M.; Sharp, P.A., The role of miRNAs in regulating gene expression networks. *Journal of molecular biology* **2013**, 425, (19), 3582-3600.
- [129]. Esquela-Kerscher, A.; Slack, F.J., Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2006**, 6, (4), 259.
- [130]. Davis-Dusenbery, B.N.; Hata, Akiko., Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *The journal of biochemistry* **2010**, 148, (4), 381-392.
- [131]. Wang, Y., et al., microRNA: Past and present. *Frontiers in Bioscience* **2007**, 12, 2316-2329.
- [132]. Schanen, B.C.; Li, X., Transcriptional regulation of mammalian miRNA genes. *Genomics* **2011**, 97, (1), 1-6.
- [133]. Starega-Roslan, J., et al., The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cellular and molecular life sciences* **2011**, 68, (17), 2859-2871.
- [134]. Ha, M.; Kim, V.N., Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* **2014**, 15, (8), 509-524.
- [135]. Connerty, P.; Ahadi, A.; Hutvagner, G., RNA binding proteins in the miRNA pathway. *International journal of molecular sciences* **2015**, 17, (1), 31-47.
- [136]. Triboulet, R., et al., Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor. *Rna* **2009**, 15, (6), 1005-1011.
- [137]. Tomari, Y.; Zamore, P.D., MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Current Biology* **2005**, 15, (2), 61-64.

- [138]. Kim, V.N., MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology* **2005**, 6, (5), 376-385.
- [139]. Lee, Y., et al., Drosha in primary microRNA processing. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2006**, 71, 51-7.
- [140]. Yeom, K., et al., Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic acids research* **2006**, 34, (16), 4622-4629.
- [141]. Quick-Cleveland, J., et al., The DGCR8 RNA-binding heme domain recognizes primary microRNAs by clamping the hairpin. *Cell reports* **2014**, 7, (6), 1994-2005.
- [142]. Melo, S. A.; Esteller, M., Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer. *Seminars in Cancer Biology* **2014**, 27, 46-51.
- [143]. Graves, P.; Zeng, Y., Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **2012**, 10, (5), 239-245.
- [144]. Finnegan, E.F.; Pasquinelli, A.E., MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **2013**, 48, (1), 51-68.
- [145]. Tran, N.; Hutvagner, G., Biogenesis and the regulation of the maturation of miRNAs. *Essays in biochemistry* **2013**, 54, 17-28.
- [146]. Davis, B.N.; Hata, A., Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling* **2009**, 7, (1), 18.
- [147]. Yang, M.; Mattes, J., Discovery, biology and therapeutic potential of RNA interference, microRNA and antagomirs. *Pharmacology & therapeutics* **2008**, 117, (1), 94-104.
- [148]. Catalanotto, C.; Cogoni, C.; Zardo, G., MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International journal of molecular sciences* **2016**, 17, (10), 1712-1729.
- [149]. Wilson, R.C.; Doudna, J.A., Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics* **2013**, 42, 217-239.
- [150]. Azlan, A.; Dzaki, N.; Azzam, G., Argonaute: The executor of small RNA function. *Journal of Genetics and Genomics* **2016**, 43, (8), 481-494.
- [151]. Pillai, R.S.; Bhattacharyya, S.N.; Filipowicz, W., Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms?. *Trends in cell biology* **2007**, 17, (3), 118-126.
- [152]. Chekulaeva, M.; Filipowicz, W., Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current opinion in cell biology* **2009**, 21, (3), 452-460.
- [153]. Filipowicz, W.; Bhattacharyya, S.N.; Sonenberg, N., Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet* **2008**, 9, (2), 102-14.
- [154]. Feig, J.L., et al., How microRNAs modify protein production. *J invest Dermatol* **2015**, 135, (5), 1-5.
- [155]. Bushati, N.; Cohen, S.M., microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, 23, 175-205.

- [156]. Ruby, J.G., Jan, C.H., Bartel, D.P., Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* **2007**, 448, 83-6.
- [157]. Abdelfattah, A.M.; Park, C.; Choi, M.Y., Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular concepts* **2014**, 5, (4), 275-287.
- [158]. Lawrie, C.H., MicroRNAs in hematological malignancies. *Blood reviews* **2013**, 27, (3), 143-154.
- [159]. Song, S.J.; Pandolfi, P.P., microRNAs in the pathogenesis of MDS and myeloid leukaemia. *Current opinion in hematology* **2014**, 21, (4), 276.
- [160]. Fatica, A.; Bozzoni, I., Role of microRNAs in hematological malignancies. *Expert review of hematology* **2009**, 2, (4), 415-423.
- [161]. Costa, A.; Osório, C.; Dias, S., MicroRNA expression profiling in bone marrow: implications in hematological malignancies. *Biotechnology journal* **2009**, 4, (1), 88-97.
- [162]. Gounaris-Shannon, S.; Chevassut, T. The role of miRNA in haematological malignancy. *Bone marrow research* **2013**, 1-12.
- [163]. Fatica, A.; Fazi, F., MicroRNA-regulated pathways in hematological malignancies: how to avoid cells playing out of tune. *International journal of molecular sciences* **2013**, 14, (10), 20930-20953.
- [164]. Fang, J.; Varney, M.; Starczynowski, D.T., Implication of microRNAs in the pathogenesis of MDS. *Current pharmaceutical design* **2012**, 18, (22), 3170-3179.
- [165]. Rhyasen, G.W.; Starczynowski, D.T., Deregulation of microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **2012**, 26, (1), 13-22.
- [166]. Weiss, C.N.; Ito, K., A Macro View of MicroRNAs: The Discovery of MicroRNAs and Their Role in Hematopoiesis and Hematologic Disease. In: *International review of cell and molecular biology*. Academic Press: New York; 2017, p. 99-175.
- [167]. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J., Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols* **2008**, 3, (6), 1101.
- [168]. Yılmaz A., et al. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. In: *Polymerase Chain Reaction*. InTech, 2012.p.229-54.
- [169]. Kubista, M., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **2006**, 27,(3), 95-125.
- [170]. Zhang, L., et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, 105, (19), 7004-7009.
- [171]. Palmero, E.I., et al. Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genetics and molecular biology* **2011**, 34, (3), 363-370.
- [172]. Liao, Q.; Wang, B.; Xia, Li., and Jiang, G., miRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2017**, 8, (2), 3666.

- [173]. Trino, S., et al. MicroRNAs as new biomarkers for diagnosis and prognosis, and as potential therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *International journal of molecular sciences* **2018**, 19, (2), 460.
- [174]. Kwon, S. Y., et al. Complexity in regulation of microRNA machinery components in invasive breast carcinoma. *Pathology & Oncology Research* **2014**, 20, (3), 697-705.
- [175]. Guo, Y., et al., Silencing the double-stranded RNA binding protein DGCR8 inhibits ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion. *Pharmaceutical research* **2015**, 32, (3), 769-778.
- [176]. Kim, B., et al., An essential microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 is up-regulated in colorectal carcinomas. *Clinical and experimental medicine* **2014**, 14, (3), 331-336.
- [177]. Lawrie, C.H., et al., Aberrant expression of microRNA biosynthetic pathway components is a common feature of haematological malignancy. *British journal of haematology* **2009**, 145, (4), 545-548.
- [178]. Fardmanesh, H., et al., Upregulation of the double-stranded RNA binding protein DGCR8 in invasive ductal breast carcinoma. *Gene* **2016**, 581, (2), 146-151.
- [179]. Gomz-Cabello, D., et al., Regulation of the microRNA processor DGCR8 by the tumor suppressor ING1. *Cancer research* **2010**, 70, (5), 1866-1874.
- [180]. Kim, W.C.; Lee, C.H., The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochim Biophys Acta* **2009**, 1796, (2), 99-113.
- [181]. Kian R.; Moradi, S.; Ghorbian, S. Role of components of microRNA machinery in carcinogenesis. *Exp. Oncol* **2018**, 40, (1), 2-9.
- [182]. Lin, S; Gregory, R. I., MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer* **2015**, 15, (6), 321.
- [183]. Lee, Y., et al., The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **2003**, 425, 415-9.
- [184]. Yan, Min., et al. Dysregulated expression of dicer and drosha in breast cancer. *Pathology & Oncology Research* **2012**, 18, (2), 343-348.
- [185]. Guo, X., et al. The microRNA-processing enzymes: Drosha and Dicer can predict prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology* **2012**, 138, (1), 49-56.
- [186]. Zonouzi, A.A.P., et al., Impaired expression of Drosha in breast cancer. *Breast Dis* **2017**, 37, (2), 55-62.
- [187]. Wang, X., et al., c-Myc modulates microRNA processing via the transcriptional regulation of Drosha. *Scientific reports* **2013**, (3), 1942.
- [188]. Kawai, Shinji.; Amano, Atsuo., BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J Cell Biol* **2012**, 197, (2), 201-8.

- [189]. Kim, K. Y., et al., A multifunctional protein EWS regulates the expression of Drosha and microRNAs. *Cell death and differentiation* **2014**, 21, (1), 136-145.
- [190]. Trabucchi, M., et al., How to control miRNA maturation? Co-activators and co-repressors take the stage. *RNA biology* **2009**, 6, (5), 536-540.
- [191]. Alemdehy, M. F., et al., Dicer1 deletion in myeloid-committed progenitors causes neutrophil dysplasia and blocks macrophage/dendritic cell development in mice. *Blood* **2012**, 119, 4723-4730.
- [192]. Alemdehy, M.F.; Erkeland, S.J. Stop the dicing in hematopoiesis: what have we learned?. *Cell Cycle* **2012**, 11, (5), 2799-2807.
- [193]. Zhu, D.X., et al., Downregulated Dicer expression predicts poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer science* **2012**, 103, (5), 875-881.
- [194]. Zhang, Z., et al, EIF2C, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression and associated with poor prognosis in bladder carcinoma. *Tumor Biology* **2015**, 36, (7), 5071-5079.
- [195]. Faber, C., et al., Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer. *European journal of cancer* **2011**, 47, (9), 1414-1419.
- [196]. Chiosea, S. et al., Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer research* **2007**, 67, (5), 2345-2350.
- [197]. Torres, A., et al., Major regulators of microRNAs biogenesis Dicer and Drosha are down-regulated in endometrial cancer. *Tumor Biology* **2011**, 32, (4), 769-776.
- [198]. Karube, Y., et al., Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer science* **2005**, 96, (2), 111-115.
- [199]. Yu, X.; Li, Z., The role of TARBP2 in the development and progression of cancers. *Tumor Biology* **2016**, 37, (1), 57-60.
- [200]. Kim, Y., et al., Deletion of human tarbp2 reveals cellular microRNA targets and cell-cycle function of TRBP. *Cell reports* **2014**, 9, (3), 1061-1074.
- [201]. Van Kouwenhove, M.; Kedde, M.; Agami, R., MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nature Reviews Cancer* **2011**, 11, (9), 644-656.
- [202]. Caramuta, S., et al., Role of microRNAs and microRNA machinery in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood cancer journal* **2013**, (3), 1-12.
- [203]. Caramuta, S., et al., Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. *Endocrine-related cancer* **2013**, 20, (4), 551-564.
- [204]. Lin, X., et al., Up-regulation and worse prognostic marker of cytoplasmic TARBP2 expression in obstinate breast cancer. *Medical Oncology* **2014**, 31, (4), 868-79.
- [205]. De Vito, C., et al., A TARBP2-dependent miRNA expression profile underlies cancer stem cell properties and provides candidate therapeutic reagents in Ewing sarcoma. *Cancer cell* **2012**, 21, (6), 807-821.

- [206]. Huang, V., et al., Ago1 Interacts with RNA polymerase II and binds to the promoters of actively transcribed genes in human cancer cells. *PLoS genetics* **2013**, 9, (9), 1-16.
- [207]. Mondal, T., et al. Argonaute-1 Machinery Silent Cancer Noises. *Can surg* **2016**, 102, 28-30.
- [208]. Wang, M., et al., AGO1 may influence the prognosis of hepatocellular carcinoma through TGF- β pathway. *Cell death & disease* **2018**, 9, (3), 324-36.
- [209]. Parisi, C., et al., Ago1 and Ago2 differentially affect cell proliferation, motility and apoptosis when overexpressed in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS letters* **2011**, 585, (19), 2965-2971.
- [210]. Völler, D., et al., Argonaute family protein expression in normal tissue and cancer entities. *PloS one* **2016**, 11, (8), 1-14.
- [211]. Melo, S. A.; Esteller, M.. A precursor microRNA in a cancer cell nucleus: get me out of here!. *Cell Cycle* **2011**, 10, (6), 922-925.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Kenan ÇEVİK

Doğum Tarihi : 25.02.1985

E-mail: kenancevik@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2004-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Mersin Üniversitesi	2009-2012
Doktora	Tıbbi Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2012-2018

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör.	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2011-2018

ESERLER

Makaleler

1. Balkan M, Atar M, Erdal ME, Rustemoğlu A, Yıldız I, Gunesacar R, Hatipoğlu NK, Bodakçı MN, Ay OI, **Çevik K**. Possible Association of FAS and FASLG Polymorphisms with the Risk of Idiopathic Azoospermia in Southeast Turkey, *GENETIC TESTING AND MOLECULAR BIOMARKERS*, 2014, 18, 383-388.
2. Karakas, U.; Ay, O.; Ay, M.; Wang, W.; Sungur, M.; **Çevik, K.**; Dogru, G.; Erdal, M. Regulating the Regulators in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Genetic Association Study of microRNA Biogenesis Pathways. *MARY ANN LIEBERT INC*, 2017, 21, 352-358.
3. Doğru, G.; Ay, M; Cevik, K; Ay OI. Miyeloproliferatif Neoplazmlara Moleküler Genetik Yaklaşım. *NOBEL MEDİCUS*, 2017, 13, 12-21.

KİTAPLAR:

Uluslararası - Kitapta Bölüm Yazma

1. Ay, M.; Doğru, G.; Çevik, K.; Ay, O. RESEARCHES ON SCIENCE AND ART in 21 ST CENTURY TURKEY, ISBN: 978-605-180-771-3, gece publishing, Baskı Sayısı: 1, Baskı Adet Sayısı: 500, 1548 Sayfa, İngilizce, Ankara, Türkiye, 2017.
2. Çevik, K., Ay, M.E.; Çevik, Ö.S.; İzci Ay, Ö.; Kabasakal, T. THE MOST RECENT STUDIES IN SCIENCE AND ART, ISBN: 978-605-288-357-0, gece publishing, Baskı Sayısı: 2, Baskı Adet Sayısı: 1, 1131 Sayfa, İngilizce, Ankara, Türkiye, 2018.

Poster Bildirileri

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

1. Yüksel, D.; AY, Ö.; AY, M.; Tezol, O.; Doğru, G., **Çevik K**, Karakaş Ü, Çayan F, Buran İ, Erdal ME. The case of der(5)t(5;14)mat caused by adjacent 1 meiotic segregation in prenatal diagnosis. *ESGH-2016*, Abstract Book, 602, Barcelona, İspanya, 2016.
2. Buran, İ; AY, M.; Doğru, G.; AY, O.; Karakaş, Ü., **Çevik K**, Yüksel D, Dilek U, Erdal ME. Aneuploidy findings on two different pregnancy loss materials from the same mother. *ESHG 2016*, Abstract Book, 582, Barcelona, İspanya, 2016.
3. Doğru, G.; AY, Ö.; Türsen, Ü.; AY, M.; **Çevik, K**; Karakaş, Ü; Derici Yıldırım, D; Erdal, ME. Effect of MIR-3680, MIR-4495, MIR-6824-5P Expression Levels in Vitiligo. *2nd International Dermatology and Cosmetology Congress*, Abstract Book, 39-40, İstanbul, Türkiye, 2017.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler:

1. Ay Öİ, Ay ME, Doğru G, Karakaş Ü, **Çevik K**, Yüksel D, Çayan F, Durukan H, Yıldırım Derici D, Erdal ME. Evaluation of Prenatal Cytogenetic Data with in-situ Culture Method. *Gevher Nesibe Tıp Günleri & Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları Kongresi*, Erciyes Med j 2016;38(1): 36. Kayseri, Türkiye, 2016.
2. Köksal V, Tiftik EN, Tombak A, AY ME, Bekalp Yılmaz İ, **Çevik K**. Varyant PH Kromozomlu KML Olgu Sunumu. 42. Ulusal Hematoloji Kongresi. Abstract Book, 151, Antalya, 2016.
3. **Çevik K**, Ay ME, İzci Ay Ö, Dilek UK, Çayan FE, Sürer S, Şenli H, Doğru G, Karakaş Ü, Erdal ME: Prenatal Tanıda Saptanan Perisentrik İnversiyon 12 Olgusu. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Abstract Book, 31, Antalya, 2011.

4. Ay Öİ, Ay ME, Çayan FE, *Doğru G*, Tekin S, **Çevik K**, Karakaş Ü, Erdal ME. Fetusta trizomi 18 ile sonuçlanan maternal kökenli t(7;18) olgusu. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Abstract Book, 396, Aydın, 2013.
5. **Çevik K**, Ay ME, Ateş F, Ay Öİ, Sungur MA, Erdal ME. İrritabl barsak sendromlu hastalarda leptin ve leptin reseptör gen polimorfizmlerinin araştırılması. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Abstract Book, 295-296, Aydın, 2013.
6. Ay ME, Söylemez F, Ay Öİ, Turan F, **Çevik K**, Yolal D, Tiftik EN, Tombak A, Erdal ME. 1305 olgunun kemik iliği sitogenetik verileri. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Abstract Book, 398-399, Aydın, 2013.

