



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KRONİK MİYELOİD LÖSEMİLİ HASTALARDAN TEDAVİYE
YANITLI ve YANITSIZ OLANLARIN BCR-ABL MİKTARI ile
miRNA DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Murat YURT

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hilmi İSİ

DIYARBAKIR -2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİLİ HASTALARDAN TEDAVİYE
YANITLI ve YANITSIZ OLANLARIN BCR-ABL MİKTARI ile
miRNA DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Murat YURT

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Hilmi İSİ

DIYARBAKIR -2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi **Murat Yurt**' un hazırladığı “**Kronik Miyeloid Lösemili Hastalardan Tedaviye Yanıtlı ve Yanıtsız Olanların Bcr-Abl Miktarı ile miRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması**” başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 25/10/2018

Danışman Doç. Dr. Hilmi İSİ Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Üyeleri

Jüri Başkanı	Prof. Dr. Nurcan Aras	Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye	Prof.Dr.M.Orhan Ayyıldız	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye	Doç. Dr. Hilmi İsi	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye	Doç. Dr. Halit AKBAŞ	Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye	Doç.Dr. Selahattin TEKEŞ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi

imza

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07.11/20.18 tarih ve 26/13 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

07.11.2018
Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

03/09/2018

Murat YURT

m. yurt

TEŞEKKÜR

Tez hocam olarak açıklandığı gün büyük mutluluk duyduğum, kendisi ile çalışmaktan zevk aldığım, etik çalışması ile bana örnek olan, doktora eğitimimi tamamlamam için önüme sunduğu bütün imkanlar ve destekleri için Tıbbi Biyoloji ABD Başkanı, Danışman Hocam Sayın Doç.Dr. Hilmi İsi'ye,

Tezimin ortaya çıkmasından, sonlanmasına kadar her basamakta katkısı olan, bilgi birikimini ve yardımlarını esirgemeyen, teşekkürlerin az kalacağı, Hematoloji-Doku Tiplleme Laboratuvarımızın Sorumlusu, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı, Sayın Prof.Dr. M.Orhan Ayyıldız'a,

Destekleri için Tıbbi Biyoloji ABD Öğretim Üyesi, Sayın Doç.Dr.Selahattin Tekeş'e,

Destekleri için Tıbbi Biyoloji ABD Öğretim Üyesi, Sayın Doç.Dr.Selda Şimşek'e,

Tezimin istatistik kısmı için yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik ABD Öğretim Üyesi, Sayın Prof.Dr. Zeki Akkuş'a

Destekleri için Tıbbi Biyoloji ABD' ndan çalışma arkadaşlarım Mahir Binici ve İlyas Yücel'e

Teknik konularda ve deneysel aşamalarda yardımlarını esirgemeyen İsmail Hakkı Taş'a,

Hematoloji-Doku Tiplleme Laboratuvarı çalışanlarımız Aslı Altundereve Sidar Çelik'e,

Mesafe olarak uzak olmamıza rağmen, tezimin her aşamasında hep yanımda olan Mehmet Demirci'ye,

Her türlü halime katlanan, hayatım süresince ihtiyacım olan desteği sağlayan ve her koşulda yanımda olduğunu içtenlikle hissettiren sevgili eşime,

Her zaman hayata umutla bakmamı sağlayan biricik kızlarıma,
Benim bugünlere gelmemde katkılarını hiçbir zaman unutamayacağım sevgili aileme,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Bu Tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **TIP.17.005** No'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
1.1. ÖZET.....	1
1.2. ABSTRACT	2
2. GİRİŞ ve AMAÇ	3
3. GENEL BİLGİLER	8
3.1. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	8
3.1.1. Kronik miyeloid lösemi tanımı ve epidemiyolojisi.....	8
3.1.2. Kronik Miyeloid Lösemi Moleküler Biyolojisi	10
3.2. Mikro RNA (miRNA)	18
3.2.1. miRNA'ların genomik dağılımı	19
3.2.2. miRNA'ların yapısı	20
3.2.3. miRNA biyogenezi ve mekanizması.....	21
3.2.4. miRNA'ların biyolojik rolleri	25
3.2.5. Normal hematopoezde miRNA'lar	25
3.2.6. Normal hematopoezden malign hematopoeze miRNA'lar	27
3.2.7. miRNA ve kanser	28
3.2.8. miRNA ve lösemi.....	28
3.2.9. miRNA 148b	30
3.2.10. miRNA 150	31
3.2.11. miRNA 130b	32
3.2.12. miRNA 10a	32
3.3. KML' de Kullanılan Tanı Yöntemleri.....	33
3.3.1. Konvansiyonel sitogenetik yöntem	33
3.3.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)	34
3.3.3. Moleküler genetik yöntemler	35

4. GEREÇ ve YÖNTEM	37
4.1. Gereç	37
4.1.1. Materyal	37
4.1.2. Kullanılan cihazlar	38
4.1.3. Kullanılan kitler ve kimyasallar	38
4.2. Yöntem	39
4.2.1. Bcr-Abl miktarları için örneklerden RT-PCR analizinin yapılması ...	39
4.2.1. miRNA Düzeyleri İçin Plazma Örneklerinden RT-PCR Analizinin Yapılması	44
5. BULGULAR.....	51
5.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi	51
5.2. Real-Time PCR Cihazında Bcr-abl Analizinin Yapılması.....	52
5.3. miRNA Düzeyleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Analizi ile Kat Değişimlerinin Hesaplanması.....	57
5.3.1. Kat-değişimi (Fold change)	57
5.4. Gruplara Göre miRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	58
6. TARTIŞMA	65
7. SONUÇ	69
8. KAYNAKLAR	70
9. ÖZGEÇMİŞ	79
10. EKLER.....	80
10.1. ETİK KURUL ONAYI.....	80
11. ORJİNALLİK RAPORU.....	81

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABL	: Abelson Leukemia
AHKHN	: Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli
ALL	: Akut Lenfoblastik Llösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ATM	: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	: Adenozin trifosfat
BCR	: Breakpoint Cluster Region
BCR/ABL	: Breakpoint Cluster Region/Abelson Leukemia
BCL-2	: B-hücre lösemi protein-2
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ERK	: Ekstraselüler sinyal-Regüle Kinaz
FISH	: Floresan In situ Hibridizasyon
GAP	: GTPase Aktivating Protein
GEF	: Guanin Exchange Factor
GRB-2	: Growth faktör reseptör bağlanma proteini
IFN-α	: İnterferon-alfa
IRIS	: International Randomized Study of Interferon and STI571
KB	: Kilobaz
kDa	: Kilo Dalton
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
LAP	: Lökosit Alkalen Fosfataz
M-BCR	: Majör BCR
m-BCR	: Minör BCR
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
miRNA	: mikro RNA
MMR	: Majör Moleküler Yanıt
μ-BCR	: Mikro BCR
μl	: Mikrolitre
Myc	: Myelositomatozis Onkogeni

ncRNA	: non-coding RNA
NES	: Nükleer Export Sinyalleri
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyalleri
Onko-miR	: Onkogenik miRNA
ORF	: Open Reading Frame / Açık Okuma Zinciri
Ph	: Philadelphia Kromozomu
PKC	: Protein Kinaz C
Pol II	: Polimeraz II
Pol III	: Polimeraz III
Pre-miRNA	: Precursor miRNA / Öncül miRNA
Pri-miRNA	: Primary miRNA / Primer miRNA
qRT-PCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
STAT	: Sinyal Transducer and Activator of Transcription
SH 1, 2, 3	: Src homoloji bölgeleri
SNP	: Single Nükleotide Polymorphism / Tek nükleotid polimorfizmi
siRNA	: Small İnterferans RNA / Küçük İnterferans RNA
TK	: Tirozin Kinaz
TKİ	: Tirozin Kinaz İnhibitörü
t(9;22)	: 9.ve 22. kromozom arasındaki translokasyon
THY	: Tam Hematolojik Yanıt
TSY	: Tam Sitogenetik Yanıt
TMY	: Tam Moleküler Yanıt
UTR	: Untranslated Region
XPB	: Xeroderma Pigmentosum-B

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: 9.kromozom ile 22. kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Ph kromozomunun oluşumu.....	10
Şekil 2: Abl proteininin yapısı.....	12
Şekil 3: Abl genindeki alternatif kırık noktaları.....	12
Şekil 4: Bcr proteini ve fonksiyonel bölgeleri.....	13
Şekil 5: Bcr proteinin yapısı.....	14
Şekil 6: Alternatif üç kırık noktası (Bcr geni).....	14
Şekil 7: Alternatif kırıklar sonucu oluşan farklı Bcr-Abl transkriptleri.....	16
Şekil 8: Kodladıkları proteinlere göre Bcr-Abl, Bcr ve Abl genleri.....	16
Şekil 9: Bcr-Abl hibrid geni ile aktive olan sinyal yolları görülmektedir.....	18
Şekil 10: Pri-miRNA'nın yapısı.....	20
Şekil 11: miRNA ve hedef mRNA eşleşme bölgesi.....	21
Şekil 12 : miRNA biyogenezinin aşamaları.....	24
Şekil 13: Normal hematopoezde miRNA ekspresyonu.....	26
Şekil 14: Hematopoezin farklı basamaklarında yer alan miRNA'lar.....	30
Şekil 15: FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri.....	35
Şekil 16: Çalışmada kullanılan miRNA genlerinin amplifikasyon grafiği.....	49
Şekil 17: Hasta gruplarının kontrol grubuna göre kat değişimi grafiği.....	58
Şekil 18: Yeni tanı grubunun kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları.....	61
Şekil 19: Yanıtlı hasta grubunun kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları.....	62
Şekil 20: Yanıtsız hasta grubunun kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları.....	63
Şekil 21 : Tedaviye yanıtsız hasta grubunun yanıtlı hasta grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları.....	64

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Lösemi Oluşumunda yer alan miRNA'lar .	29
Tablo 2: miR 148/152 ailesi baz dizilimi	30
Tablo 3: Konvansiyonel sitogenetik, FISH ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması	36
Tablo 4: mRNA' dan cDNA oluşturmak için miks hazırlama tablosu	41
Tablo 5: mRNA' dan cDNA oluşturmak için Thermal Cycler Protokolü	42
Tablo 6: Bcr-Abl için Real Time PCR bileşenlerinin tepkime hacimleri.	43
Tablo 7: Bcr-abl için Real Time PCR tepkime koşulları	43
Tablo 8: miRNA' dan cDNA elde etmek için mix hazırlığı	45
Tablo 9: miRNA' dan cDNA sentezi için Thermal Cycler protokolü	46
Tablo 10: Çalışmada kullanılan miRNA primer dizileri	46
Tablo 11: miRNA çalışmasında cDNA'nın zenginleştirilmesi için PCR koşulları	47
Tablo 12: cDNA'nın zenginleştirilmesi için PCR koşulları	47
Tablo 13: Real Time PCR için kullanılan bileşenlerin oranları	48
Tablo 14: Real time PCR tepkime koşulları	48
Tablo 15: miRNA genlerinin Real Time PCR cihazındaki Ct değerleri	50
Tablo 16: Cinsiyetlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının değerlendirilmesi	52
Tablo 17 : Yeni tanı hasta grubuna ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları	53
Tablo 18: Tedaviye yanıtlı hasta grubuna ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları	54
Tablo 19 : Tedaviye yanıtız hasta grubuna ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları	55
Tablo 20 : Kontrol grubuna ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları	56
Tablo 21: Yeni tanı grubunun kontrol grubuna göre kat değişimleri	59
Tablo 22 : Tedaviye yanıtlı grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri	59
Tablo 23 : Tedaviye yanıtız grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri	59
Tablo 24 : Tedaviye yanıtız grubun yanıtlı gruba göre kat değişimleri	59

Kronik Miyeloid Lösemili Hastalardan Tedaviye Yanıtlı ve Yanıtsız Olanların Bcr-Abl Miktarı ile miRNA Düzeylerinin Karşılaştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı : Murat Yurt
Danışmanı : Doç.Dr. Hilmi İsi
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji

1.1. ÖZET

Amaç: Kanser ve genetik ilişkisine ait çalışmalarda keşfedilen mikroRNA'ların hastalıkla ilişkileri sadece malignitelerle sınırlı olmayıp, kalp hastalıklarından santral sinir sistemine kadar birçok hastalık grubunda rol oynadıkları bilinmektedir. Çalışmamızda, KML'li hastalarda Bcr-Abl ve miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik. Yeni tanı almış, tedavilerine yanıt alınmış ve tedavilerine yanıt alınamamış hastalarda hem Bcr-Abl miktarlarını hem de miRNA düzeylerini tespit etmeyi amaçladık. Bu üç farklı hasta grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile miRNA'ların hem tanı anında biyobelirteç olarak kullanılabilmesi, hem de ilaç direncinin erken dönemlerde tespit edilerek en uygun tedavi şeklinin belirlenmesine katkı sağlayabileceği düşüncesiyle bu çalışmayı planladık.

Gereç ve Yöntem: Bu tez çalışmasına yeni tanı almış ve KML tanısıyla izlenmekte olan 75 hasta ve kontrol grubu olarak 25 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Çalışma için hastalardan ve kontrol grubundan alınan tam kan materyallerinden RNA izolasyonları yapıldıktan sonra Real Time Pcr cihazında hem Bcr-Abl hem de miR-10a, miR-150, miR-148b, miR-130b gen ekspresyonlarına bakıldı.

Bulgular: İyi prognoz olduğu ileri sürülen miR-10a gen ifadesi, yeni tanı ve yanıtlı hasta gruplarında yüksek bulundu. İyi prognoz olduğu ileri sürülen miR-150 ve kötü prognoz olduğu ileri sürülen miR-148b gen ifadeleri yanıtsız hasta grubunda düşük bulundu.

Sonuç: KML hastalarında miR-10a'nın teşhis ve tedavi takiplerinde biyomarker olarak kullanılabilceğini, miR-150 ve miR-148b gen ifadelerinin azalmasının tedaviye yanıt alınamamasında anlamlı olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Sözcükler: KML, Bcr-Abl, miR-10a, miR-150, miR-148b

Comparison of Bcr-Abl and miRNA Expression Levels in Treatment-Responsive and Treatment-Unresponsive Patients with Chronic Myeloid Leukemia

Student's Surname and Name : Yurt Murat
Adviser of Thesis : Associate Professor Hilmi İsi
Department : Medical Biology

1.2. ABSTRACT

Aim: It is known that the microRNAs discovered in cancer and genetic association studies are not only limited to malignancies but play a role in many disease groups, from heart diseases to the central nervous system. In our study, we examined the relationship between Bcr-Abl quantities and miRNA levels in patients with CML. Aim was identified both Bcr-Abl quantities and miRNA levels in patients who were newly diagnosed, with and without response to treatment. So miRNAs could be used as biomarkers at the time of diagnosis as well as determining the optimal treatment method to compare between patient groups and healthy controls by determining miRNA levels.

Material and Method: In this study, 75 patients who were newly diagnosed or followed up with CML and 25 healthy subjects were included as control group. After RNA isolation from the whole blood materials taken from patients and control groups, both Bcr-Abl and miR-10a, miR-150, miR 148b, miR-130b gene expressions were examined in Real Time Pcr.

Results: miR-10a gene expression, which was suggested to good prognosis, was upregulated in the new diagnosis and response patient groups On the other hand, gene expression of miR-150 and miR-148b, which were suggested to good and poor prognosis respectively, were downregulated in the patient group with outresponse.

Conclusion: We believe that miR-10a can be used as a biomarker in diagnostic and therapeutic follow-ups in CML patients, and that the decrease in miR-150 and miR-148b gene expressions is not significant in response to treatment.

Key Words: KML, Bcr-Abl, miR-10a, miR-150, miR-148b

GİRİŞ ve AMAÇ

Bir hematopoetik pluripotent kök hücre hastalığı olan kronik miyeloid lösemi (KML)' de miyeloid seri hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Miyeloproliferatif bir neoplazi olarak sınıflandırılmaktadır (1). Tanımlanması 1845 yılında olmuştur (2). KML'li hastalarda 1960 yılında Peter Nowel ve David Hungerford tarafından anormal bir kromozom tanımlanmış ve bulunduğu şehrin adıyla Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılmıştır (3). KML olgularının yaklaşık %95'inde tespit edilmekte olan Ph kromozomunun resiprokal bir translokasyon sonucu olarak kromozom 9'daki Abelson (ABL) protoonkogeni ile kromozom 22' deki Breakpoint Cluster Region (BCR) geninin 22. kromozom üzerinde füzyonu sonucu ortaya çıkmış anormal 22. kromozom olduğu gösterilmiştir (4).

KML'nin insidansı 1-2/100000 olup erişkin lösemilerin yaklaşık %15-20'sini oluşturmaktadır (1). Erkeklerde görülme sıklığı daha fazladır (Erkek/Kadın:3/2) ve 40-60 yaş aralığında daha çok görülür. Tanı genellikle rutin testler sırasında tespit edilen lökositozun incelenmesi ile konur. KML'nin klinik seyrinde üç evre bulunmaktadır. Kronik evre %85 oranında olup hastaların çoğunluğunu oluşturmaktadır. Diğer evreler, %10 oranında hızlanmış (akselere) evre ve hastaların %5'ini oluşturan blastik evredir (5).

Arsenik ve radyoterapi 20. yüzyılın başlarında KML tedavisinde kullanılmaktayken (1), lösemi alanındaki ilk randomize çalışmalardan birisinde (1968 yılında) "Busulfan" tedavisinin radyoterapiye üstün olduğu gösterilmiştir (6). Hastalarda hematolojik yanıt elde etmek ve semptomatik rahatlama sağlanması için kullanılmakta olan radyoterapi ile busulfan ve sonrasında hidrokşi üre gibi sitotoksik ajanlar genel sağkalım üzerinde anlamlı bir artışa neden olmamışlardır. İnerferon-alfa (İFN- α) tedavisi hematolojik yanıtı ek olarak hastalarda sitogenetik düzelme ve sağkalım artışına neden olabilmektedir. Ancak gerek parenteral uygulanması ve gerekse yan etkileri nedeniyle İFN- α hastalar açısından tercih edilen bir tedavi seçeneği olmamaktadır. Uzun süreli remisyon sağlanması ve %50' ye yakın kür oranı ile önemli bir tedavi seçeneği olan "Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli"nin (AHKHN), KML tedavisindeki endikasyonları, Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörü

(TKİ) olan İmatinib Mesilatın (STI571) klinik uygulamaya girmesinden sonra sınırlanmış ve imatinib dönemi başlamıştır. Daha sonra bunu ikinci kuşak TKİ'ler izlemiştir (dasatinib, nilotinib). Kronik evre KML'de, imatinib, hematolojik, sitogenetik ve hatta moleküler remisyon sağlayabilmektedir. İmatinib Mesilat, kronik faz KML'de Faz III randomize bir çalışma olan "International Randomized Study of Interferon and STI571" (IRIS) çalışması sonrası standart tedavi olmuştur (7). İmatinib mesilat ile KML'de %97 tam hematolojik yanıt (THY), %82 tam sitogenetik yanıt (TSY) elde edildiği, IRIS çalışmasının beş yıllık verilerine göre elde edilmiştir. Akselere veya blastik evre gelişmeden sağ kalım yaklaşık %93, genel sağ kalım ise %90 olarak bildirilmiştir (8). Yine aynı IRIS çalışmasının sekiz yıllık verilerinde ise genel sağ kalım %85, hastalıksız sağkalım %81 olarak elde edilmiştir (9). IRIS çalışmasının son derece olumlu sonuçlarına rağmen hastaların yaklaşık %10-25'i imatinib mesilat tedavisinin üçüncü ayında "Tam Hematolojik Yanıt"a ulaşmamaktadır (8,10). Ayrıca hematolojik ve sitogenetik yanıt gelişmiş olan hastaların %20'si zaman içerisinde bu yanıtlarını kaybedebilmektedirler (11). İmatinib tedavisinin ilk üç ayı içerisinde tam hematolojik yanıt gelişmemesi, altı ay içerisinde sitogenetik yanıt gelişmemesi, onikinci ayda majör sitogenetik yanıtın oluşmaması, on sekizinci ayda tam sitogenetik yanıtın olmaması veya onikinci ayda majör moleküler yanıt gelişmemesi primer direnç olarak kabul edilir. Oluşmuş olan hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtın kaybolmasına ise sekonder direnç denilir (12).

Kanser ve genetik ilişkisine ait çalışmalarda keşfedilen mikroRNA'lar (miRNA) son derece güncel moleküllerdir. İnsanlardaki keşfi 2000'li yıllara dayanan miRNA'lar 1993 yılında tanımlanmıştır (13). Küçük endojen bir RNA kümesi olan ve messenger RNA (mRNA) üzerinden etkisini gösteren miRNA'lar 19-25 nükleotid büyüklüğündedir. miRNA'lar insan genomundaki RNA'ların %1-5'ini oluşturmaktadır. Hedef mRNA'ların fonksiyonlarını etkileyerek etkisini gösteren miRNA'ların sayısı 2000'nin üzerine çıkmıştır. miRNA'lar hedef mRNA'ları tanıdıktan sonra; mRNA'ların parçalanması ya da translasyonun baskılanması şeklinde işlev görmektedir (15). "Tümör Supresör miRNA" lar normal hücre ve dokularda protoonkogenlerin translasyonunu inhibe ederken, "onkogenik miRNA'lar bazı kanser hücrelerinde protoonkogenleri aktive etmekte ve yüksek

ekspresyona sahip olmaktadır (16). Örneğin miR-21'in bir tümör baskılayıcı protein olan p53 ile etkileşimi onkogenik etkiye yol açarken, miR-let-7 ve miR-15/16'nin onkogenik bir protein olan BCL-2 ile etkileşmesi tümör baskılayıcı etki yaratmaktadır (17,18). Hastalık ilişkileri sadece malignitelerle sınırlı olmayan miRNA'ların kalp hastalıklarından santral sinir sistemine kadar birçok hastalık grubunda rol oynadığı bilinmektedir (19).

Kromozomların kanserle ilişkili olduğu bilinen kırılmalı (fajil) bölgelerinde yer alan miRNA'ların kanserle ilişkileri vardır. Bu ilişki ilk olarak Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında tespit edilmiş ve miR-15a ve miR-16-1 ifadelerinin bu hastaların çoğunda çok düşük ya da hiç eksprese edilmediği gösterilmiştir (20).

miRNA'ların tümör baskılayıcı ve onkogen olmak üzere iki şekilde işlev gördükleri düşünülmektedir. Tümör baskılayıcı olarak işlev görürken; onkogen ya da hücre farklılaşmasını veya apoptozisi kontrol eden genleri düzenleyerek kanserleri engelleyebilecekleri düşünülmüştür. Onkogen olarak işlev görürken apoptozisi kontrol eden genleri veya tümör baskılayıcı genleri negatif etkileyerek kanser gelişmesinde rol oynarlar (21).

Pekçok miRNA kanser dokularında normal dokulara göre farklı şekilde ifade edilmektedir. Örneğin; Let-7'nin ifade edilmesi akciğer kanserinde azalırken, kolon veya meme kanseri gibi diğer kanserlerde artmaktadır. Bu veriler miRNA'ların kanserlerin tespit edilmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilceğini desteklemektedir (22, 23).

KML hastalarında, teşhis ve tedavi yanıtında biyobelirteç olarak miR-150'nin, teşhis için biyobelirteç olarak miR-203'ün, KML ve AML'yi ayırt etmek için miR-17/92 kümesinin, teşhis ve ilaç yanıtı için miR-10a'nın, ilaç direncinin biyobelirteci olarak miR-29a/b'nin rolünün olduğu ileri sürülmüştür (24). Başka bir çalışmada ise KML hastaları için iyi prognoz ve kötü prognoz olan miRNA'lar gösterilmiştir (25).

Keşfedildiklerinden bu yana miRNA'ların işlev ve biyosentez mekanizmaları hakkında oldukça fazla bilgi elde edilmiştir. Düzenlenmelerindeki bozukluklar birçok kanser tipiyle ilişkilendirilmiş, ekspresyon profillerinin tanı ve tedavide faydalı kriterler sağlayacağı düşünülmüştür. Ayrıca kanserlerde düzenlenmeleri bozulmuş birçok miRNA'nın apoptotik süreçlerde rol oynadığının belirlenmesiyle tümör

oluşumunda ve sitotoksik muameleye hassasiyette miRNA'ların etkili olduğu belirlenmiştir. miRNA'lar hakkında elde edilen bunca bilgiye rağmen kanserde tanı ve tedavi amaçlı kullanımlarının pratikte uygulanabilmesi için miRNA üretiminde ve işlenmesinde rolü olan tüm enzim ve proteinler biliniyor mu? miRNA'ların transkripsiyonu tam olarak nasıl düzenleniyor? gibi soruların cevaplanması gerekmektedir.

Normal dokularda ve tümör dokularında farklı seviyelerde eksprese edilen miRNA'ların tespit edilmesi, aynı miRNA'ların insan kanserlerinde görevlerinin belirlenmesi, çeşitli kanserlerdeki rollerinin aydınlatılması için faydalı olabilir. miRNA ifade düzeyi, kanser patogenezindeki rollerini araştırmak için hareket noktası olabilir. Bir miRNA'nın kanserli hücrede az sentezlenmesi, fazla sentezlenmesi veya yokluğu kanserin başlangıcı ve gelişimindeki rolünü çalışmaya olanak vermektedir. miRNA'lar kanserin moleküler patolojisi ile ilgili sorulara yanıt olmaya aday gözükümlerdir. miRNA'ların çeşitli kanserlerde tanı ve tedavi takibinde kullanılabilmesi için hedeflerinin doğru tanımlanması ve verilerin belirli standartlara getirilmesi gerekmektedir. Her miRNA molekülü çok sayıda farklı mRNA'ya bağlanabilmekte, benzer şekilde her mRNA da farklı miRNA'lara hedef olabilmektedir. Bundan dolayı miRNA'ların ifade etkinliklerin ve hedeflerinin belirlenmesine yönelik yeni verilere ihtiyaç vardır.

Biz de bu araştırmamızda KML'li hastalarda Bcr-Abl miktarları ile miRNA düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırmayı hedefledik. Bunun için yeni tanı almış, tedavilerine yanıt alınmış ve tedavilerine yanıt alınamamış yani direnç gelişmiş hastalarda hem Bcr-Abl miktarlarını hem de miRNA düzeylerini tespit etmeyi amaçladık. Bu üç farklı hasta grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA düzeylerinin belirlenmesinin, miRNA'ların hem tanı anında biyobelirteç olarak kullanılabilmesini, hem de ilaç direncinin erken dönemlerde tespit edilerek en uygun tedavi şeklinin belirlenmesine katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Kotagama ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada, KML teşhisinde ve tedavi yanıtında bir biyobelirteç olarak miR-150'nin, teşhis için biyobelirteç olarak miR-203'ün, KML ve AML'yi ayırt etmek için miR-17/92 kümesinin, teşhis ve ilaç yanıtı için miR-10a'nın, ilaç direncinin biyobelirteçi olarak miR-29a/b'nin rolünün

olduğu ileri sürülmüştür (24). Yine Yeh ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yayınlanan “Mikro RNA’ların akut ve kronik insan lösemilerindeki klinik önemini” araştırdıkları makalelerinde genel olarak KML hastaları için kötü prognoz ve iyi prognoz olan miRNA’lar gösterilmiştir (25).

Böylece daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, miRNA’lar KML hastalarının teşhisinde kullanılabilir mi? KML hastalarının tedaviye yanıt alma süreçlerinde miRNA’ların katkısı var mı? KML hastalarının tedavi süreçlerinde gelişen ilaç direncinde miRNA’ların etkisi var mı? gibi sorulara yanıt aramaya karar verdik.

Yukarıdaki sorularımıza yanıt bulabilmek için sağlıklı bireylerde, yeni tanı almış, tedavilerine yanıt alınmış ve ilaç direnci gelişmiş KML hastalarında en yaygın olarak görülme ihtimali olan kötü prognoza sahip; miR-130b, miR-148b ve İyi prognoza sahip olan; miR-10a, miR-150 gen ekspresyonlarını araştırmayı planladık.

GENEL BİLGİLER

1.3. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

1.3.1. Kronik miyeloid lösemi tanımı ve epidemiyolojisi

Bir hematopoetik pluripotent kök hücre hastalığı olan kronik miyeloid lösemi (KML)' de miyeloid seri hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Miyeloproliferatif bir neoplazi olarak sınıflandırılmaktadır (1). KML olgularının %95' inde "Philadelphia (Ph) Kromozomu" tespit edilmektedir. Anormal bir kromozom olan Ph Kromozomu, 9. kromozomdaki "Abelson"(ABL) proto-onkogeni ile 22. kromozomdaki "Breakpoint Cluster Region"(BCR) geninin 22. kromozom üzerinde füzyonuna yol açan karşılıklı (resiprokal) bir translokasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (3,26).

KML ilk defa 1845 yılında; lökositöz, masif splenomegali ve splenomegalinin sebebinin açıklayabilecek başka bir etyolojinin belirlenemediği iki hastada, John Hugges Bennett tarafından tanımlanmıştır (2). KML erişkin lösemilerinin %15-20'sini oluşturmakta ve insidansı (yıllık) 1-2/100000'dir. Her yaşta görülmekle birlikte, sıklıkla 40-60'lı yaşlarda tanı konulmaktadır. Erkeklerde daha fazla görülür (E/K=3/2) (18). Reprodüktif çağıdaki kişilerde de azımsanmayacak oranda görülmektedir, 20-64 yaşları arasında %45,8 oranında görüldüğü bildirilmiştir (27).

KML'deki translokasyonun nedeni bilinmemektedir. Ancak Nagazaki ve Hiroşima' ya atılan atom bombaları sonrasında sağ kalanlar arasında KML insidansının yükselmiş olması, radyasyona bağlı DNA hasarı sonucu t(9;22)'nin oluşabileceğini göstermiştir (28).

KML'nin klinik seyrinde üç evre bulunmaktadır. Kronik evre %85 oranında olup hastaların çoğunluğunu oluşturmaktadır. Diğer evreler, %10 oranında hızlanmış (akselere) evre ve hastaların %5'ni oluşturan blastik evredir. Genellikle komplikasyonların görülmediği, periferik kandaki lökosit sayısı artışı ile kemik iliğindeki miyeloid maturasyonu ve proliferasyonu ile ortaya çıkan dönem kronik evredir. Kronik evre KML tedavi edilmezse, ortalama 3-5 yıl sonra akselere evreye

ilerler. Hastaların %10'u ilk iki yılında akselere ve blastik evrelere gidiş riskine sahip olmaktadır, sonraki her yıl için bu oran %15-20'dir. Hastalık çoğunlukla sinsi bir



başlangıç gösterir. Hastaların %20-50'si asemptomatiktir ve bu hastalara rutin tetkikler sırasında saptanan lökositoz ile tanı konulmaktadır. Semptomatik olanlarda ise; %34'ünde halsizlik, %3'ünde yorgunluk, %20'sinde kilo kaybı, %15'inde aşırı terleme, %15'inde abdominal dolgunluk hissi ve %21'inde trombosit fonksiyon kaybına bağlı kanama olayları sıklıkla görülmektedir (29). Akselere ve blastik evrelerde, koordinasyon bozukluğu ve konfüzyon, hiperlökositoza ve hiperviskoziteye bağlı görme bozukluğu, kulak çınlaması, priapizm, dispne gibi semptom ve bulgular hastalarda sıklıkla görülmektedir (30). Hastaların yaklaşık yarısında saptanan splenomegali KML'nin en çok başvuru fizik muayene bulgusudur. Dalak büyüklüğü ile lökosit sayısı ilişkili olup infarkt gelişmedikçe el muayenesi ile hassasiyet saptanmaz. Hepatomegali hastaların %10-20'sinde saptanabilir. Kronik evre kronik miyeloid lösemi'de nadir görülen bulgular olan cilt ve diğer doku infiltrasyonları, akselere veya blastik evre KML'de daha sık görülür. Lökositoz kronik miyeloid lösemide, tanı anında en tipik bulgudur. Granülositer seri olgunlaşmasının tüm evrelerinin (blasttan parçalı nötrofillere kadar) görülebileceği bir granülositoz durumu tabloya hakimdir. Kronik evre KML'de %10'u geçmeyen miyeloblastlar tipik olarak %1-2 civarındadır. Hastalığın erken döneminde lökosit sayısı artmadan önce bile tespit edilebilen bazofil sayısı her zaman artmış olarak bulunur. Görünümleri değişen trombositlerin sayısı hastaların %50'sinden fazlasında artmıştır. Hastaların %25'nin periferik kanında megakaryositlere rastlanır. Enfeksiyon varlığında, tedavisi sonrasında, akselere ve blastik evre esnasında yüksek bulunabilen lökosit alkalen fosfataz (LAP) yayma sonucu KML'de düşüktür (29,30). Normalde 3/1 olan miyeloid / eritroid oranı, kronik miyeloid lösemide 20/1 dir (miyeloid dizi lehine artmıştır). Artan megakaryosit sayısı ile birlikte, dalak büyüklüğü, çevresel kandaki artmış blast oranı, düşük hemoglobin ve ek kromozomal anomaliler ile ilişkilendirilen kemik iliği fibrozu tabloya eşlik edebilir (31).

Kronik miyeloid lösemi hastalarında tedaviye yanıt tanımları şu şekilde olmaktadır; Tam Hematolojik Yanıt (THY) ; Lökosit sayısının 10 000/ μ L'den küçük olması, periferik kanda bazofil sayısının %5'ten küçük olması, periferik kanda miyeloblast, promiyelosit, miyelosit görülmemesi, trombosit sayısının 450.000/ μ L'den küçük olması, el muayenesinde dalağın hisedilmemesi.

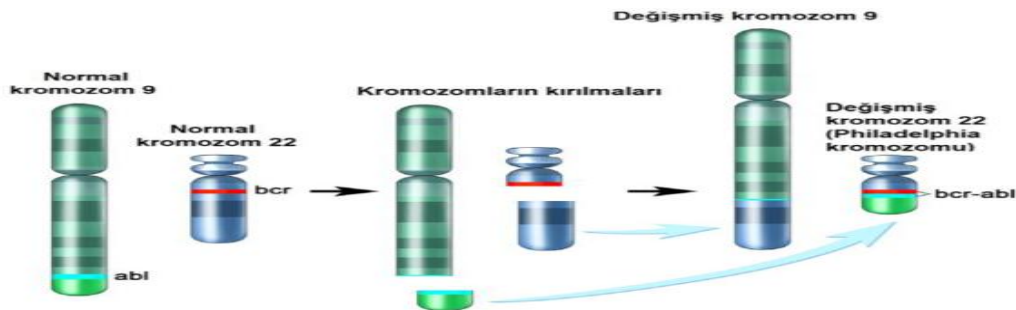
Sitogenetik Yanıt (SY); Tam sitogenetik yanıt (TSY): Philadelphia kromozomu pozitif (Ph+) metafazın olmaması, parsiyel (kısmi) sitogenetik yanıt (KSY) : Ph+ metafaz % 1- % 35, Minör sitogenetik yanıt: Ph+ metafaz % 36 – 65, Minimal sitogenetik yanıt: Ph+ metafaz % 66– 95, Sitogenetik yanıtsızlık: > % 95 Ph+ metafaz olması,

Moleküler Yanıt (MY); Majör moleküler yanıt (MMY, MY3,0): Bcr-Abl değerinin uluslararası ölçeğe (International Scale (IS)) göre % 0,1'den küçük ya da eşit olması (cDNA kopya sayılarının 10 000'den büyük olması gerekir). Moleküler yanıt 4 log (MY4,0) ; Bcr-Abl değerinin uluslararası Ölçeğe (IS) göre %0,01'den küçük olması (cDNA kopya sayılarının 10 000'den büyük olması gerekir). Moleküler yanıt 4,5 log (MY4,5); Bcr-Abl değerinin uluslararası Ölçeğe (IS) göre % 0,0032'den küçük olması (cDNA kopya sayılarının 32 000'den büyük olması gerekir) (32).

1.3.2. Kronik Miyeloid Lösemi Moleküler Biyolojisi

1.3.2.1. Kronik miyeloid lösemi sitogenetiği (Philadelphia kromozomu)

Ph kromozomu, 9. kromozomdaki Abl geni ile 22. kromozomdaki Bcr geninin resiprokal bir translokasyonu sonucu ortaya çıkmış anormal 22. kromozomdur (Şekil 1). KML'li hastaların %95'inde pozitifdir. Bu translokasyon sonucu kromozom 9q34 üzerindeki 5' Abl gen kısmı, kromozom 22q11'deki 3' Bcr gen kısmına eklenir ve füzyon Bcr-Abl geni oluşur. Kırılmanın Abl geninde sabit, Bcr geninde ise değişken olması, Abl geninin sağlıklı hücreleri değişime uğratarak kanser hücresine dönüştürdüğünü, Bcr geninin ise hastalığın fenotipini belirlediğini ortaya koymaktadır (4).

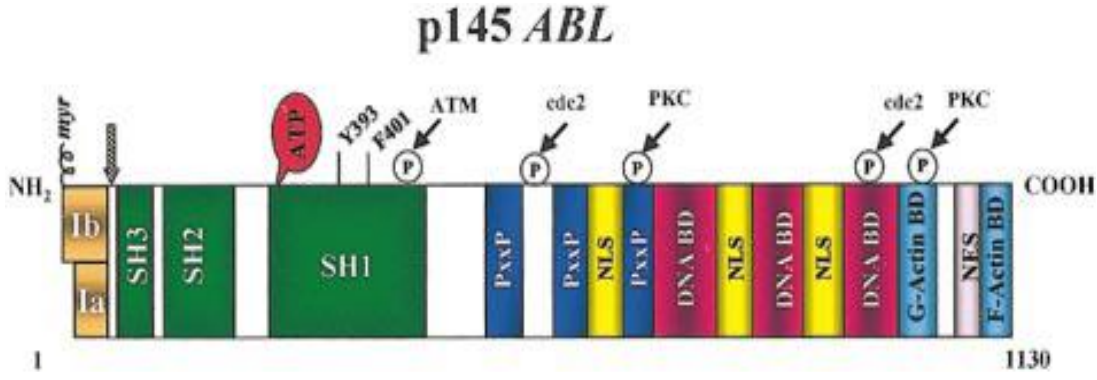


Şekil 1: 9.kromozom ile 22. kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Ph kromozomunun oluşumu (4)

1.3.2.2. Abl proto-onkogeni

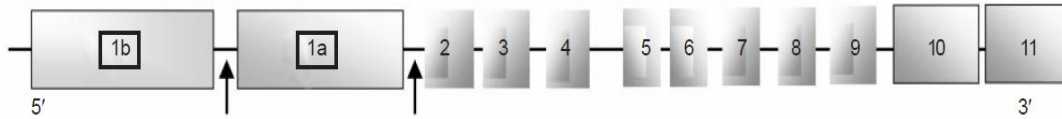
Abl geni v-Abl (Abelson murin lösemi virüs) olarak adlandırılan onkogenin insandaki homologu olup kromozom 9q34 üzerinde yer alır, 11 ekzon ve 230 kilobaz (kb) uzunluğundadır. 145 kilodalton (kd) moleküler ağırlığında olup reseptör olmayan tirozin kinazı (p145 Abl) kodlar. Abl genindeki kırılma noktası ekzon 2'nin 5' ucunu içermektedir. Bcr geninin 12. ve 16. ekzonları arasındaki 'majör breakpoint cluster' (M-Bcr) bölgesine transpoze olur (28).

Abl proteini hücre büyümesinin düzenlenmesinde, otofajinin ileri aşamalarının regülasyonunda ve sinyal iletiminde önemli role sahiptir (29,30). Abl ekspresyonu hem nükleer hem de sitoplazmik lokalizasyonludur ve sürekli (33,34). Abl proteininin N-terminal ucu üç tane SRC Homoloji bölgesi (SH) içerir. Bunlar SH1, SH2 ve SH3' tür. Abl proteininin tirozin kinaz (TK) özelliğini bu bölgeler düzenler (35). TK aktivitesine sahip olan SH1 bölgesi en önemli bölgedir. SH2 bölgesinin fonksiyonunda eksiklik olduğunda, fosfotirozine bağlanma ilgisinde eksiklik olur ve Abl proteininin transforme olma kapasitesinde azalma meydana gelir. SH3 bölgesi tirozin kinaz fonksiyonunun negatif düzenleyicisidir (36). Abl geninin ekzon 1 kısmı alternatif splisinge uğrar, Tip 1a ve Tip 1b olmak üzere iki farklı Abl proteini oluşur. Tip 1a izoformu, Tip1b' den daha kısadır (37). Abl proteini, merkezinde bulunan ve prolinden zengin PxxP bölgesi sayesinde, SH3 bölgelerine, DNA bağlanma bölgelerine (DNA Binding Determinant - DNA-BD), nükleer export sinyallerine (NES), G-monomerik ve F-filament aktin bağlanma bölgelerine ve nükleer lokalizasyon sinyallerine (NLS) bağlanır. Abl proteininin C-terminal ucunda üç tane DNA-BD, üç tane NLS, bir tane G-aktin, bir tane NES ve bir tane F-aktin bağlanma bölgesi yer alır. Fosforilasyon bölgeleri ise; Cdc2, Protein Kinaz C (PKC), Ataxia Teleangiectasia Mutated (ATM) ve tirozin 393 (Y393)'dir (**Şekil 2**) (38).



Şekil 2: Abl proteininin yapısı (38).Siyah oklar, Atm, cdc2 ve PKC fosforilasyon bölgeleri, gri ok ise Bcr-Abl füzyon geni oluşurken Abl geninde kırığın oluşabileceği bölgeyi göstermektedir.

Bcr-Abl füzyon transkriptinde ilk ekzonun bulunmamasının nedeni, transkript oluşurken, kırığın abl geninde çoğunlukla alternatif 1. ekzonlar ile 2. ekzon arasındaki intronda, 300 kb'lık bir bölge içerisinde meydana gelmesidir (**Şekil 3**). Bu nedenle transkript her zaman a2 ekzonu ile başlar ve ilk ekzon bulunmaz(39).



Şekil 3: Abl genindeki alternatif kırık noktaları (39).

1.3.2.3. Bcr geni

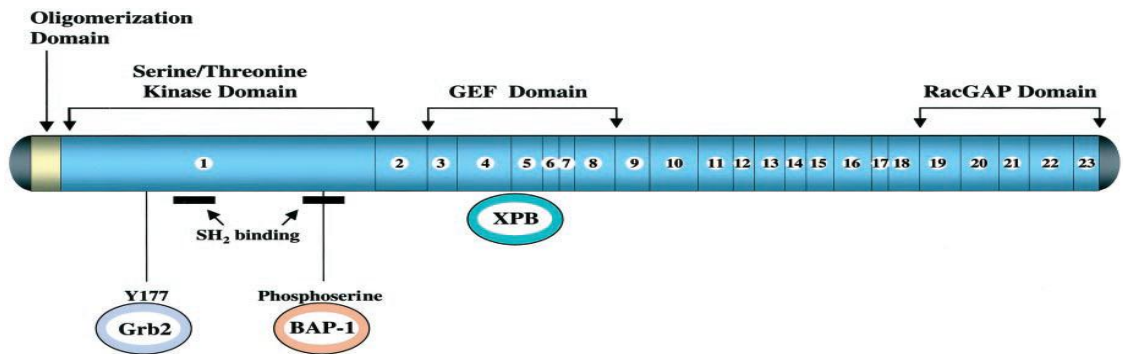
130 kb büyüklüğünde, 23 ekzona sahip Bcr geni (Breakpoint Cluster Region) 22. kromozom üzerinde bulunmaktadır. Sürekli ekspresyonu olan bir gen olup en çok hematopoetik hücreler ve beyin dokusunda ifade edilmektedir. Miyeloid farklılaşmanın erken evrelerinde ifadenmesi daha fazla olup, hücreler farklılaştıkça ifadenmesinin azaldığı belirlenmiştir. 160 kDa ağırlığında bir serin/treonin kinaz olan sitoplazmik bir bcr proteinini kodlamaktadır.

Hücre fraksiyonu ve immüno Floresan boyama çalışmaları ile bcr geninin normal ürünün sitoplazmik bir protein olduğu ve bu proteinin özellikle G proteinleri tarafından düzenlenen hücresel sinyal iletim yollarını kapsadığı yapılan

çalışmalarla gösterilmiştir. Bcr geninin ikinci bir proteinin üretiminden sorumlu olduğu ve bu bu proteinin 130 kDa ağırlığında olduğu bilinmektedir (40).

Bcr geni tarafından kodlanan bcr proteini, serin/treonin kinaz bölgesine, birden fazla Src Homology 2 (SH2) bağlayıcı bölgelerine ve bir oligomerizasyon bölgesine sahiptir. Abl kinaz aktivasyonuna neden olan bölge N- terminal ucunda yer alan oligomerizasyon bölgesidir. Bu bölge aynı zamanda hem füzyon ürünü olan Bcr-Abl' nin hem de bcr proteinin hücre içi lokalizasyonunu belirler. Bcr proteinin SH2 bölgeleri tarafından aktive edilen abl proteini, hücre içi sinyal proteinleri ve reseptörler ile etkileşir. Bundan dolayı bu bölgeler korunmuş bölgelerdir. Serin-treonin kinaz bölgesi, serin ve treonin kalıntıları ile otoposforile olmaktadır. Bcr proteininin 177. pozisyonundaki tirozinin (Y177/Tyr177) otoposforillenmesi sonucu “reseptör bağlı büyüme faktör protein 2” (Grb2)’ ye bağlanması ile bcr proteinin Ras yolağı etkileşimi gerçekleşmektedir (40).

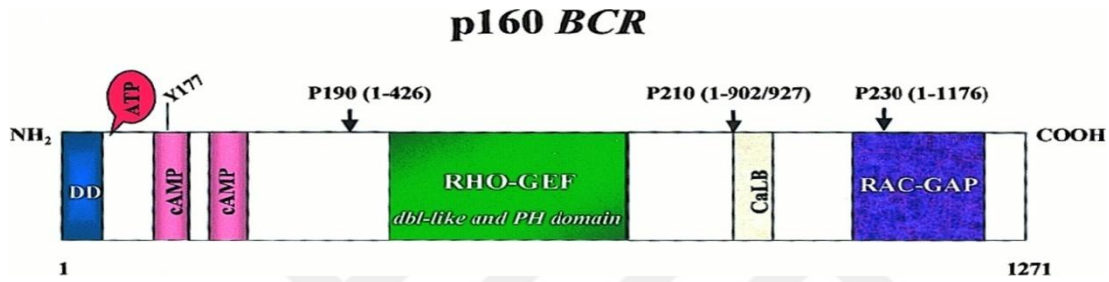
Bcr proteinin orta kısmında bulunan Guanin Exchange factor (GEF), DNA tamir mekanizmasında görev yapan Xeroderma Pigmentosum-B’yi (XPB) fosforile etmekte ve fonksiyonunu engellemektedir. Bu bölge aynı zamanda bcr-abl onkogeninin genomik instabilitesine sebep olmaktadır. Bcr proteinin C-terminal ucunda bulunan GTPase activating protein (GAP) domaini, hücre iskeleti organizasyonunda ve hücre içi sinyal yollarında görevli olan G proteinleri ile etkileşmektedir (Şekil 4) (40).



Şekil 4: Bcr proteini ve fonksiyonel bölgeleri (40)

Bcr proteininin NH₂ ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesindedir ve serin treonin kinaz kodlar. Bcr proteininin N-terminal ucunda “çift kıvrımlı yapı” in vivo ortamda dimerizasyona sebep olur. Merkezde pleckstrin-homoloji (PH) ve “diffüz

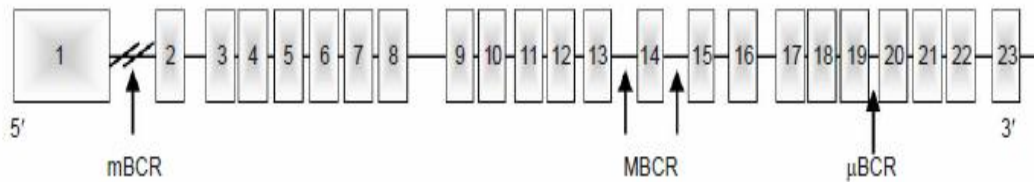
B-hücreli lenfoma'' (dbl) benzeri bölgeler bulunur. Rho guanidin exchange (değiştirme) faktörleri üzerinde bulunan guanidin trifosfatın (GTP) guanidin difosfata (GDP) dönüşümünü uyaran kısım PH bölgesidir. Rho Guanidin Değiştirme (Exchange) Faktörleri, nükleer faktör kapa beta (NF- κ B) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu sağlar. CaLB kalsiyum lipid bağlanma bölgesidir. Ras guanozin trifosfat-aktivatör protein (RAC-GAP) bölgesi olarak adlandırılan ve Ras-GTPase aktivitesine sahip olan bölge C-terminal bölgesinde bulunmaktadır. Majör-bcr (M-bcr), minör-bcr (m-bcr) ve mikro-bcr (μ -bcr) olmak üzere üç kırık bölgesine sahiptir (Şekil 5) (41).



Şekil 5: Bcr proteinin yapısı (41).

NH₂-ucunda; dimerizasyon domaini (DD) ve siklik adenosin monofosfat kinaz homolog domainleri, Grb-2'ye bağlanmak için önemli bir otoposforilasyon bölgesi olan Y177, Üst kısımdaki oklar, Bcr proteinindeki kırılma noktalarını göstermektedir. (Rho-GEF); Rho Guanidin Nükleotid Değişim Faktörü, (CaLB); Kalsiyum-bağımlı lipid bağlanma bölgesi, (Rac-GAP); Rac-GTPaz(41).

Bcr-Abl füzyon transkripti oluşurken, Bcr geninde kırık üç alternatif noktada meydana gelmektedir (Şekil 6) (41).



Şekil 6: Alternatif üç kırık noktası (Bcr geni) (41).

1.3.2.4. Bcr-Abl füzyon geni

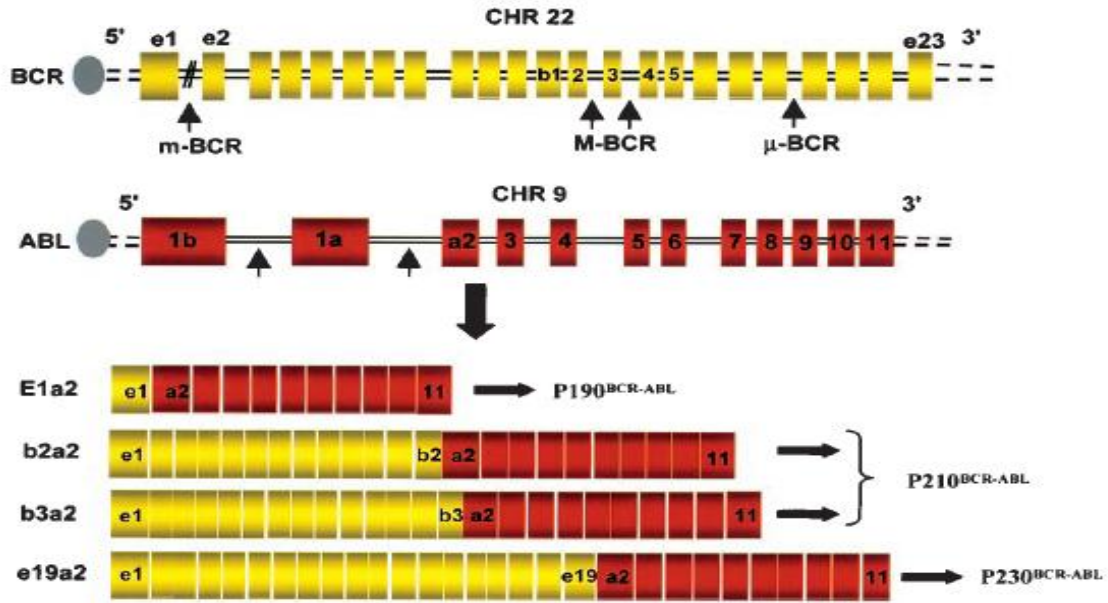
22. kromozomdaki Bcr geni ile 9. kromozomdaki Abl protoonkogeni bölgelerinin karşılıklı translokasyonu (t(9;22) (q34;q11) sonucu oluşan Philadelphia kromozomu, KML hastalarının yaklaşık %90-95'inde görülür (12). Bu translokasyon sonucu kısalmış 22. kromozom meydana gelir (Şekil 1). Meydana gelen füzyon Bcr-Abl geninin yapısal aktivasyonu gerçekleşir ve bu durum, hücrelerin mutasyon sonucu anti-apoptotik özellik kazanarak aşırı çoğalmalarına ve malign dönüşüm ile KML'nin patofizyolojik temelini oluşturmaktadır (42,43).

Bcr-Abl füzyon geni, Abl proto-onkogeninin 5'ucu ile Bcr geninin 3'ucunun bir araya gelmesiyle oluşur. Bcr-Abl geninin oluşumunda Bcr' nin farklı bölgelerinde kırıklar meydana gelir. Abl geninde kırılma genin alternatif ilk ekzonları olan ekzon 1b veya 1a ile 2. ekzon arasındaki intronda meydana gelir (38,40).

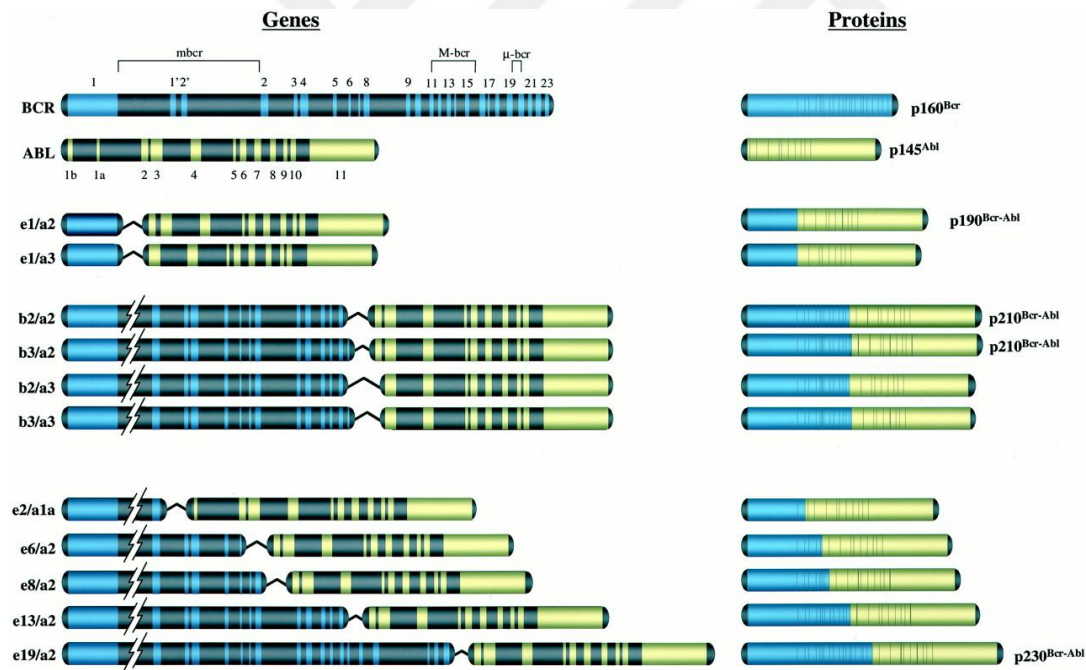
Bcr genindeki kırık 13.ekzondan (e13-b2) ya da 14. ekzondan (e14-b3) sonraki intronda meydana gelirse majör bcr-abl (M-Bcr-abl) oluşur. Meydana gelen hibrit bcr-abl geni 210 kDa ağırlığında olup b2a2 (e13a2) veya b3a2 (e14a2) bölgelerini içermektedir. p210-Bcr-Abl olarak adlandırılmakta ve KML hastalarının %95'inde, (Ph+) ALL hastalarının %35'inde bu ürün bulunmaktadır.

Kırık Bcr geninin ekzon 1'nden sonra (e1a2) oluşursa, (Ph+) ALL hastalarının %65'inde, KML ve AML hastalarının küçük bir kısmında görülen p190-Bcr-Abl füzyon proteini oluşur. Bu proteini 190 kDa ağırlığındadır.

Kronik myeloproliferatif hastalıklar (KMPH) grubunun kronik nötrofilik lösemi (KNL) türünde ve KML hastalarının küçük bir bölümünde görülen üçüncü kırık ise ekzon 19'dan sonra meydana gelir. Oluşan füzyon transkript e19a2 birleşiminden oluşup p230-Bcr-Abl proteinini (230kDa ağırlığında) kodlayan mikro-Bcr (μ -Bcr)'dir (Şekil 7, 8) (40,44).



Şekil 7: Alternatif kırıklar (bcr ve abl genlerinde) sonucu oluşan farklı Bcr-Abl transkriptleri (40).



Şekil 8: Kodladıkları proteinlere göre Bcr-Abl, Bcr ve Abl genleri (44).

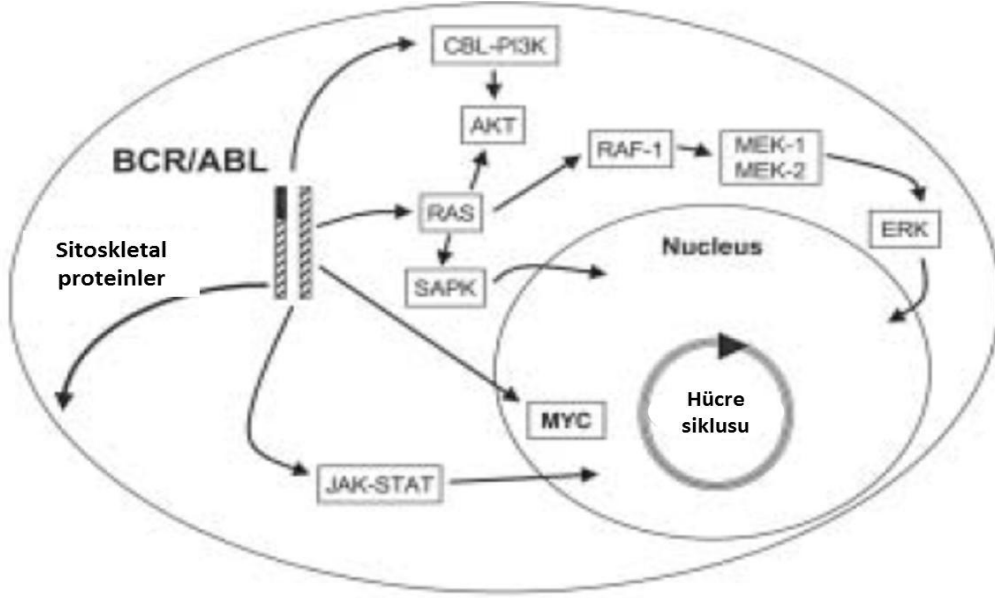
Meydana gelen hibrit Bcr-Abl proteinleri onkogenik özellik kazanarak bir takım sinyal yollarını değiştirerek hücre migrasyonu, adezyonu ve çoğalmasını etkilemektedirler. Aynı zamanda bu onkogenik proteinler DNA tamir mekanizmalarını da etkilemektedirler. Hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunan

normal p145 c-abl proteini DNA'ya bağlanarak normal fonksiyonunu yerine getirir. Füzyon p210-Bcr-Abl ve diğer onkogenik Bcr-Abl proteinleri ise sadece sitoplazmada bulunmakta, DNA'ya bağlanamamaktadır (45).

Bcr-Abl proteininin Abl'ye ait ve tirozin kinazı kodladığından dolayı onkogenik transformasyonda önemli rol oynamakta olan Src-homolog 1 (SH1) bölgesi, SH2 bölgesi (protein yapımını etkileyen), C-terminal kısmında, nükleer lokalizasyon sinyal bölgesi, DNA bağlanma (DNA-BD) ve aktin bağlanma bölgeleri gibi işlevsel kısımları vardır. Bcr-Abl proteininin Bcr' ye ait kısmı ise, aktin bağlayıcı fonksiyonları (c-abl ile ilişkili) aktive etmekte hem de abl tirozin kinaz aktivitesini düzenlemektedir. Bcr proteininin 177. pozisyonundaki tirozinin (Y177/Tyr177) otofosforillenmesi lökomogenez için önemlidir (46). Fosforilasyon sonucu oluşan kalıntı "reseptör bağlı büyüme faktör protein 2" (Grb2)' nin Src- homolog 2 (SH2) bölgesine bağlanmasını sağlar. Grb2' nin bu şekilde aktive olması Src-homology 3 (SH3) bölgesine bağlanan "RAS' a etkili guanin nükleotidi" (SOS) ve "Grb2 ilişkili protein 2 (GAB2) oluşumunu arttırmaktadır. RAS, SOS tarafından aktive edilmektedir. "Fosfotidilinositol-3-kinaz" (PI3K) ve SHP2 salınımını sağlayan ise GAB2'nin fosforilasyonudur. SHP2, birçok tirozin kinaz sinyal yolağının içinde bulunduğu RAS ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz yolağının normal aktivasyonu için de gereklidir (47). Src kinaz olan Hck, füzyon Bcr-Abl geni tarafından fosforile olur. Fosforile olan Hck "Sinyal İletim ve Transkripsiyon Aktivatörü" (STAT 5)'i aktive eder. Hematopoetik kök hücre transformasyonu üzerine Bcr-Abl'nin etkisi RAS, STAT5 ve PI3K aktivasyonu aracılığıyla olmaktadır (48,49).

Ayrıca birçok malignitede programlanmış hücre ölümünü etkilediği düşünülen "Myelositomatozis" (Myc) yolu aktivasyonu (Bcr-Abl'ye bağlı) da SH2 üzerinden olmaktadır (50).

Aşağıdaki şekilde Bcr-Abl füzyon geni ile aktive olan sinyal yolları mekanizmaları gösterilmektedir (**Şekil9**) (51).



Şekil 9: Bcr-Abl hibrid geni ile aktive olan sinyal yolları görülmektedir (51).

BCR-ABL: Breakpoint Cluster Region - Abelson füzyon geni, **AKT:** Protein Kinaz B, **ERK:** Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz, **MEK:** Mitojen Aktive Protein Kinaz, **JAK:** Januskinaz, **STAT:** Sinyal iletim ve Transkripsyon aktivatorü, **SAPK:** Stres Aktive Protein Kinaz.

1.4. Mikro RNA (miRNA)

MikroRNA'lar (miRNA'lar) 20-23 nükleotid (nt) uzunluğunda, kodlama yapmayan, küçük, tek iplikli (sarmallı) RNA dizileridir. miRNA'lar hedef mRNA'ların 3'UTR (Untranslated Region-Çevirim yapılmayan bölge), 5'UTR veya ORF (Open reading frame-Açık okuma Zinciri) bölgelerine bağlanarak translasyonel baskılamaya veya mRNA'nın parçalanmasına neden olurlar. miRNA'lar çok hücreli organizmalarda gen ifadelerini düzenlemektedirler (52).

İlk miRNA 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından; yuvarlak solucan *Caenorhabditis Elegans* (*C. elegans*)'ta yapılan çalışmayla keşfedilmiştir. Lee ve arkadaşları, *C. elegans*'ta lin-4 olarak adlandırdıkları genin 22 nt uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiğini fakat bu RNA'nın hiçbir proteini kodlamadığını rapor etmişlerdir. 2000 yılında ise yine *C. elegans*'ta let-7 diye adlandırılan ve canlılığın gelişimini düzenleyen başka bir miRNA keşfedilmiştir. Daha sonraki yıllarda hemen

hemen bütün organizmalarda birçok miRNA molekülü keşfedilmiş ve 2001 yılından itibaren mikroRNA (miRNA) terimi kullanılmaya başlanmıştır (53).

Bugüne kadar 1881'i öncül (prekürsör), 2588'i de olgun miRNA insan genomunda belirlenmiştir (54).

İnsanlardaki miRNA miktarının tüm genomun %1-5'i olduğu ve bu miRNA'ların protein kodlayan genlerin %30'unu düzenledikleri tahmin edilmektedir. Bu da düzenleyici mekanizmasının düşünüldüğünden daha yaygın olduğunu göstermektedir (55).

miRNA'ların adlandırmasında "mir" ön eki kısaltması ve bir sayısal değer bulunmaktadır. Sayısal değer o güne kadar tespit edilen miRNA sayısına göre verilmektedir. "mir-" takısındaki küçük "r" pre-miRNA'yı, büyük "R" (miR) olgun miRNA'yı temsil etmektedir. miRNA'nın ait olduğu türü belirtmek için ilgili türe ait kısaltma en başa yazılır (Hsa-miR-10a gibi) (Hsa: Homo Sapiens). Benzer dizilere sahip miRNA'ları isimlendirmek için miR adı ve sayısal değerden sonra bir ek kullanılır. Örneğin; miR-10a dizisi miR-10b dizileri benzer dizilere sahip oldukları için a ve b şeklinde yazılmaktadır. Genomda farklı bölgelerde yerleşmiş ve birbirinin aynısı olan pre-miRNA'ları belirtmek için en sona bir sayısal değer yazılmaktadır. Örneğin; hsa-mir-221-1 ve hsa-mir-221-2 pre-miRNA'ları aynı olgun miRNA'yı oluşturmaktadırlar fakat genomda farklı bölgelere yerleşmiş olarak bulunurlar. Olgun miRNA, pre-miRNA'nın hangi kolundan köken alırsa ilgili dizinin ucuna göre -3p veya -5p son eki adlandırmanın sonuna yazılır. Pre-miRNA'ların kollarının ekspresyon düzeyleri biliniyorsa, düşük düzeyde ifade edilen miRNA'yı belirtmek için arkasına yıldız işareti konur. Örneğin; miR 130 ve miR-130* bir pre-miRNA saç tokasını paylaşırlar fakat ifade edilme farklılığından dolayı miR-130 hücrelerde daha fazla bulunmaktadır (56).

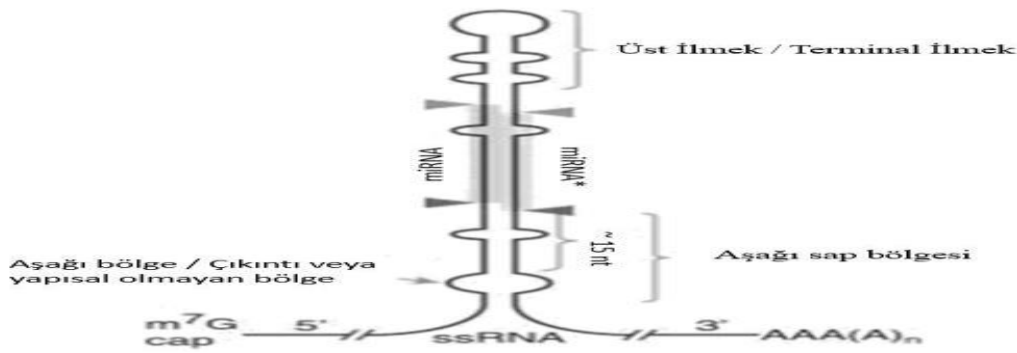
1.4.1. miRNA'ların genomik dağılımı

miRNA öncülleri genomun farklı bölgelerinde kümelenmiş halde, çoğunlukla genler arası (intergenik) bölgelerde bulunurlar. Y kromozomu hariç bütün kromozomlara dağılmış haldedirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar memeli miRNA'larının çoğunun, intergenik bölgelerden başka genomun farklı bölgelerine de lokalize olduklarını göstermiştir. Günümüzde miRNA genleri genomik dağılımlarına

göre; protein kodlamayan yazılım birimindeki ekzonik miRNA'lar, protein kodlayan yazılım birimindeki intronik miRNA'lar ve protein kodlamayan yazılım birimindeki intronik miRNA'lar olarak gruplandırılır (57).

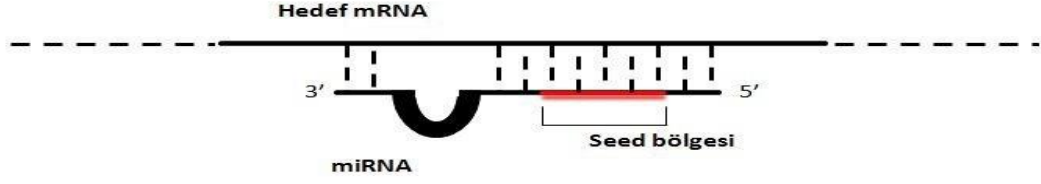
1.4.2. miRNA'ların yapısı

Memeli miRNA'ları önce pri-miRNA (primer-miRNA) olarak adlandırılan sap-ilmek (stem-loop) yapıdaki yaklaşık 80 nt'lik bir kolun parçası olarak transkribe olurlar. Bazı miRNA'lar (örn: hsa-miR-15a ve hsa-miR-16-1) kümeler halinde organize olmuşlarken, çoğu insan miRNA'ları genomik olarak tek tek bulunur. Pri-miRNA'lar, 3'ucunda poli-A kuyruğu ve 5'ucunda 7-metilguanozin içerirler (**Şekil 10**). Bu uçlar ve ilmek yapısı miRNA olgunlaşma sürecinde, Drosha ve Dicer enzimleri ile kesilirler (58-60).



Şekil 10:Pri-miRNA'nın yapısı (58-60).

miRNA'nın 5'ucunda hedef mRNA ile eşleşmesini sağlayan kısımlar bulunmaktadır. Bu bölgeler tanıma-eşleşme bölgeleri (seed region) olarak adlandırılır (**Şekil 11**). Post-transkripsiyonel aşamada gen regülasyonunu düzenleyebilmeleri için miRNA'ların, seed regionları ile, hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesindeki miRNA tanıyıcı kısımlara (MTK), 2-9 bazlık eşleşme yapması gerekmektedir. Bu seed bölgelerinin eş olduğu miRNA'ların ise aynı mRNA'ları hedeflediği bilinmektedir. Fakat miRNA'lar seed bölgeleri dışında tüm ~22 nt'lik dizi olarak evrimsel olarak korunduklarından dolayı aslında tüm dizi halinde hedef mRNA özgünlüğüne katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (61, 62).



Şekil 11: miRNA ve hedef mRNA eşleşme bölgesi (61, 62).

1.4.3. miRNA biyogenezi ve mekanizması

miRNA mekanizması ve biyogenezi ile ilgili çalışmalar hala başlangıç aşamasında olduğundan dolayı tanımlanan çoğu miRNA'nın işlevi bilinmemektedir. Yapılan gen ifade çalışmaları ile miRNA'ların işlevleri araştırılmaktadır. Elde edilen veriler, miRNA ifadelerinin belirli tümörlerde değişime uğradığını göstermekte, bu da miRNA'ların kanser ve diğer hastalıkların gelişiminde rol alabileceğini akla getirmektedir (53).

miRNA biyogenezi iki aşamada gerçekleşir; önce nükleer kesim ve sonra sitoplazmik kesim. Bu iki aşamada; önce miRNA geni transkribe olur ve pri-miRNA'yı oluşturur. Bu süreç pre-miRNA (öncül miRNA) ve son olarak da miRNA dubleksinin (miRNA: miRNA*) oluşumuyla devam eder (miRNA dubleksinde, anlamsız iplik yıldız işareti ile ifade edilmektedir) (55).

Nükleer kesim; Genler arası bölgelerde yer alan miRNA öncülleri Polimeraz II (Pol II) ve Polimeraz III (Pol III) tarafından transkribe edilir ve tek iplikli sap-ilmek yapısındaki pri-miRNA'yı oluşturur. Buna karşın; protein kodlayan yazılım biriminin intronlarında yer alan miRNA'lar Pol II tarafından pre-mRNA'nın bir parçası olarak transkribe olurlar. Öncelikle miRNA'lar Pol II ve Pol III aracılığı ile uzun pri-miRNA'lara dönüştürülürler. Olgun miRNA'ların oluşumundaki ilk basamak pri-miRNA'ların mikroprosesör olarak adlandırılan heterodimerik kompleks ile kesimidir. Mikroprosesör kompleks RNase III enzimi formundaki Drosha ve substrat tanınmasında Drosha'ya yardımcı olan RNA bağlanma domainini içeren; DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 veya Pasha)'den meydana gelmektedir. 5' şapka ve 3' poli A kuyrukları nükleus içinde mikroprosesör kompleks ile kesilerek yaklaşık 60 nt uzunluğunda saç tokası yapısındaki pre-

miRNA'lara dönüştürülürler. Böylece 5' fosfat ve yaklaşık 2 nt içeren 3' uçlar oluşur. Nükleus içerisindeki pre-miRNA'lar nükleustan dışarı, nükleositoplazmik taşıma faktörü olan Ran-GTP ve Exportin-5 reseptörü ile birleşerek taşınırlar (55).

Sitoplazmik kesim; Sitoplazmaya taşınmış pre-miRNA'lar Dicer enzimi ile kesilerek 20-22 nt uzunluğundaki olgun miRNA formuna dönüştürülürler. Dicer enzimi birkaç işlevsel domainden oluşur. Bunlar pre-miRNA'nın 3' ucundaki nükleotidlere yüksek afiniteye bağlanma eğilimindeki Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) domaini, Helikaz domaini, "domain of unknown function 283" (DUF283) alt ünitesi, dsRNA bağlanma domaini ve iki RNaz III katalitik domainidir. Dicer enziminin pre-miRNA'ya bağlanması PAZ domaininin miRNA'nın 3' ucundaki iki nükleotidi tanımasıyla gerçekleşir (55). Pre miRNA'ya dubleks kısmından bağlanan Dicer enzimi pre-miRNA'nın sap bölgesini ve terminal baz çiftlerini kesip atar. Kesim sonucunda small interferans RNA (siRNA) benzeri, kusurlu bir miRNA dubleksi oluşur (61). Bu dubleks olgun miRNA ile pre-miRNA'nın karşı kolundan köken alan aynı uzunluktaki bir fragmentten (miRNA*) meydana gelir (55).

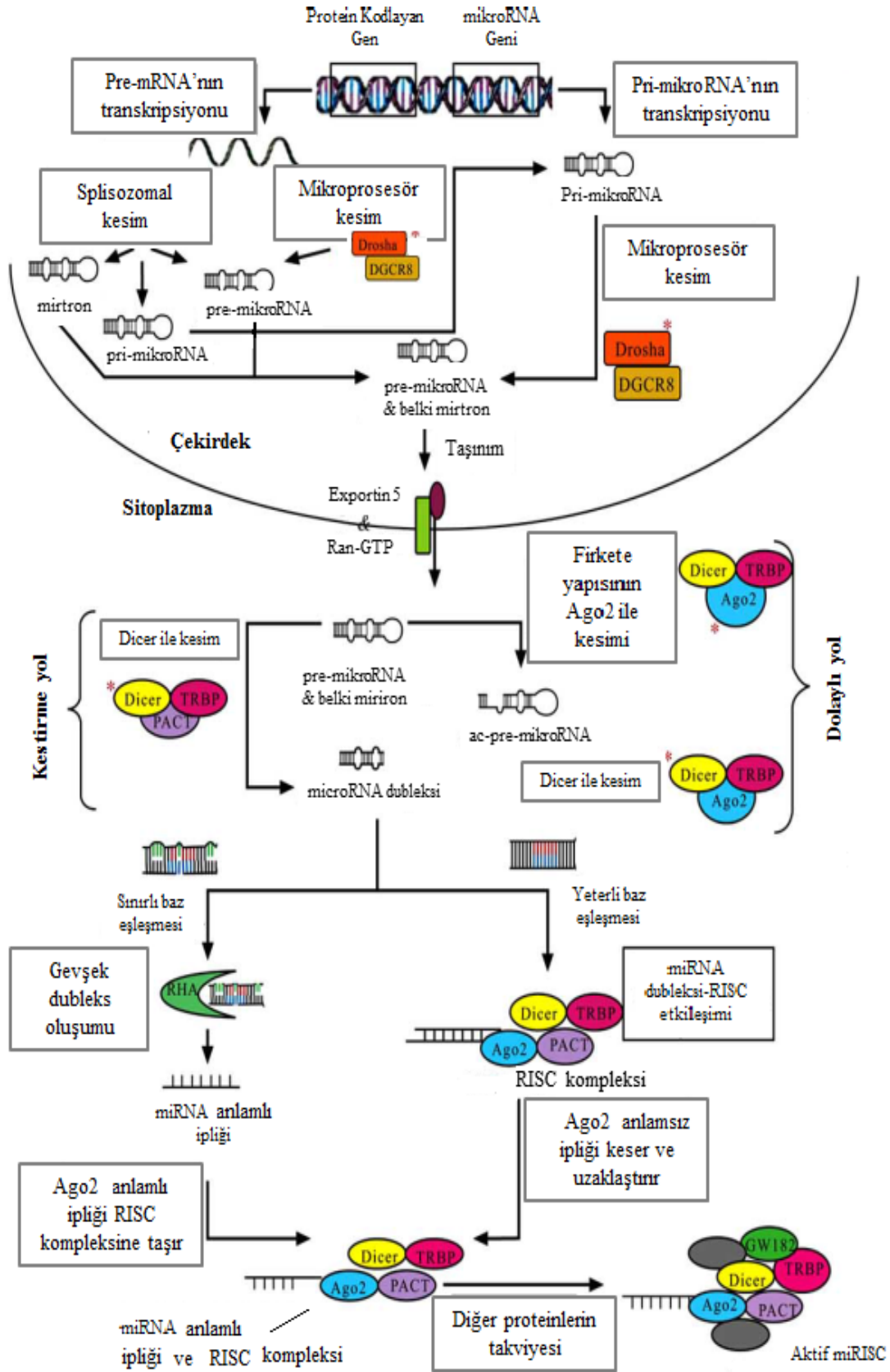
Olgun miRNA ipliği, indüklenmiş susturma kompleksi RNA-induced silencing complex (RISC)] olarak bilinen protein kompleksi ile etkileşime girer. İnsanlardaki miRNA ve RISC birleşme mekanizması belirsizdir. miRNA-miRNA* dubleksinin çözülme mekanizması bilinmemekle birlikte birkaç hipotez ileri sürülmektedir. Bunlardan biri: Dicer'in miRNA* ipliğini kestiği ve böylece olgun miRNA ipliğinin serbest kaldığıdır. Diğer bir hipotez ise; RISC'in konformasyonel değişimi ile dupleksin kendiliğinden çözüldüğü veya tanımlanamayan helikazlar yardımıyla ayrıldığıdır. Ayrıca RISC kompleksini oluşturan proteinlerden biri olan Argonaute-2 (Ago-2)'nin de miRNA* ipliğini kesebildiği varsayılmaktadır (55).

İnsanlarda, 4 tane argonaute proteini (Ago 1-4) etrafında merkezi şekilde yerleşmiş, protein kompozisyonuna bağlı olarak değişen sekiz sınıf RISC kompleksi vardır. Bu proteinlerden sadece Ago-2 proteini susturucu özellik gösterir ve mRNA'nın kesilmesini katalizler. Aktifleşmiş RISC, olgun miRNA ipliği ve hedef mRNA'nın 3' UTR bölgesi arasındaki Watson-Crick baz eşleşmesiyle hedef mRNA'ya bağlanır (55).

miRNA ve hedef mRNA arasındaki baz eşleşmesi büyük oranda miRNA ipliğinin merkez bölgesinde (5' ucundaki 2-8 rezidü) meydana gelir. Bu durumda

mRNA'nın kesimi Ago-2 proteini tarafından katalizlenir. Kesim sonucu açığa çıkan ürünler hücresel mRNA yıkımından sorumlu iki süreç ile yıkılırlar. İlki mRNA'daki poliA kuyruğunun uzaklaştırılma işlemidir. Bir sonraki yıkım ise 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi gösteren eksozom ile meydana gelir (55).

Eğer mRNA miRNA'ya yeterli bir komplementerlik göstermiyorsa veya birden fazla komplementer bölgeye sahip ise bu durum baz eşleşmelerinin zayıf olmasına ve RNA dublexi üzerinde çıkıntılar oluşmasına sebep olur. Bu oluşumlar Ago-2 proteininin susturucu etkinliğini baskılar ancak hedef mRNA'nın translasyonunu baskılama yeteneğini etkilemez. miRNA'ların translasyonu nasıl baskılandıkları tam olarak netlik kazanmasa da bunun çeşitli yollarla olduğu düşünülmektedir. Deneyler translasyonun; başlama ve uzama aşamalarında baskılandığını göstermektedir (55). miRNA biyogenezinin tüm aşamaları **Şekil 12'**de gösterilmektedir.



Şekil 12 : miRNA biyogenezinin aşamaları (55).

1.4.4. miRNA'ların biyolojik rolleri

miRNA olgunlaşmasından sonra, genellikle miRNAya bağlı gen susması; hedef mRNA'nın 3'UTR'si ile tam olmayan baz eşleşmesi yapan miRNA'nın translasyonu baskılaması ve mRNA degradasyonu ile sonuçlanır (63). miRNAlar, hedef mRNA'nın 5'UTR bölgesi, açık okuma çerçevesi (ORF) ya da doğrudan DNA dizisi ile de etkileşme girerek transkripsiyonu düzenlemektedir. Ayrıca, miRNAların gen anlatımını baskılayıcı özelliklerinin yanısıra bazen özel durumlarda mir-369-3'ün tumor nekrosiz faktör α (TNF α)'nın anlatımını arttırıcı özelliğinde olduğu gibi onkogenik rolü de olduğu keşfedilmiştir (64).

miRNA'lar apoptoz, kalp gelişimi, lipid metabolizması, insülin salgılanması, kök hücre farklılaşması, kas farklılaşması, antijen tanınması ve yaşlanma gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenlerler (55).

Yapılan çalışmalarla, *Drosophila*'da apoptozun düzenlenmesinde ve hücre farklılaşmasında (14), *c.elegans*'da nöral simetride (65), insanlarda hematopoietik farklılaşma, hematopoietik hücre gelişimi ve lökomojenezde (66) etkili olan birçok özgül miRNA tanımlanmıştır.

1.4.5. Normal hematopoezde miRNA'lar

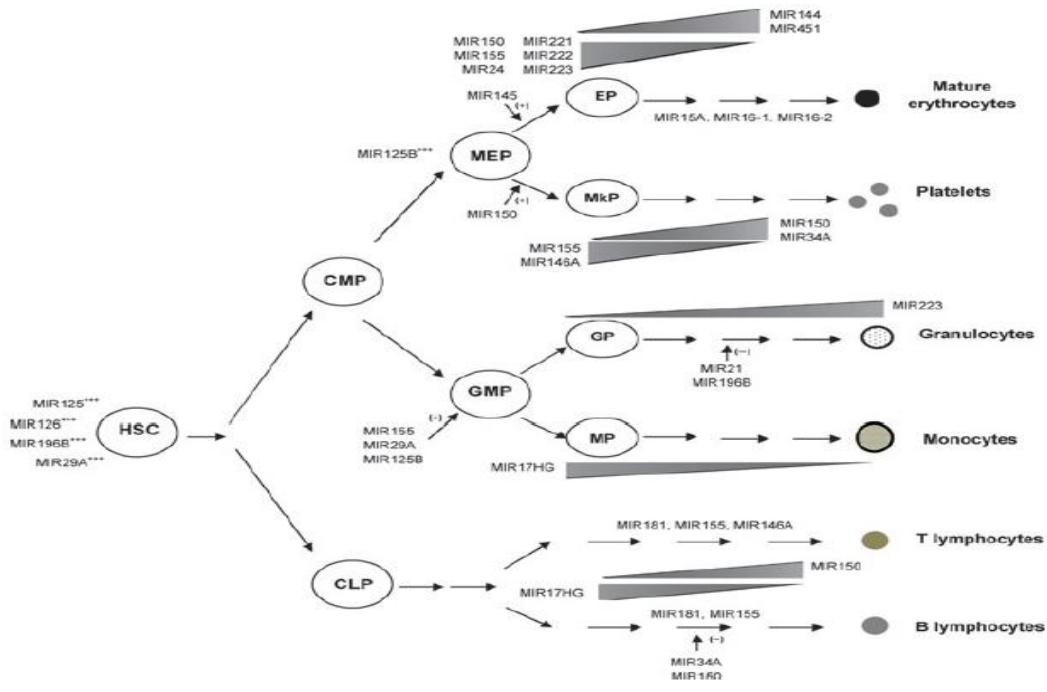
miRNA'lar, hematopoezin hemen her evresinde kritik roller üstlenirler. Örneğin miR-150 ve miR-155, B ve T lenfosit diferansiyasyonunu kontrol eder, miR-221 ve miR-222, hücre yüzeyi büyüme faktör reseptörü olan c-KIT'i hedef alarak eritroid diferansiyasyonu bloke eder, miR-223 granülopoezisi indükler (**Şekil 13**) (67-69).

miRNA'lar ile hematopoezisin ilişkisini gösteren ilk çalışma, 2004 yılında yayınlanmıştır. Bu yayında Chen ve arkadaşları, sıçan kemik iliğinden 150 miRNA'yı klonlamıştır ve miR-181'in, miR-223'ün ve miR-142'nin baskın olarak hematopoetik hücrelerde eksprese edildiğini, miR-181'in ise özellikle kemik iliğinin B-lenfoid hücrelerinde yüksek miktarlarda eksprese edildiğini göstermiştir. Hematopoetik kök hücrelerde miR-181'in ektopik ekspresyonu, in vivo ve in vitro olarak B-lenfoid hücrelerin miktarında artışla sonuçlanmıştır. Ek olarak, miR-223 ve miR-142'nin, miyeloid hücrelerde de yüksek miktarda eksprese edildiği görülmüştür.

Bununla beraber, bu iki miRNA'nın ektopik ekspresyonu, beklenen aksine, B veya miyeloid hücrelerde değil, T hücrelerin miktarında artışla ilişkili bulunmuştur (70).

Diğer yandan başka bir çalışmada, miR-155, miR-223, miR-181 ve miR-142'nin insan ve fare hematopoetik hücrelerindeki ekspresyon biçimleri farklı bulunmuştur (71).

Hematopoziste miR-150 çok önemlidir. Olgun T ve B lenfositlerde (öncüllerinde değil) eksprese olur. Sıçan hematopoetik dokusunda, B ve T hücre olgunlaşması esnasında ekspresyonu artar, olgun T lenfositlerin Th1 ve Th2 hücelere dönüşümü esnasında ise azalır (72).



Şekil 13: Normal hematopoziste miRNA ekspresyonu (67-69).

HSC: Hematopoetik StemCell (Hematopoetik Kök Hücre), CMP: Common Miyeloid Progenitör (Ortak Miyeloid öncüller), CLP: Common Lenfoid Progenitor (Ortak Lenfoid öncüller), MEP: Megakaryosit-Eritrosit Progenitör (Ortak Megakaryosit ve eritrosit öncüller), GMP: Granülosit-Monosit Progenitör (Ortak Granülosit ve monosit öncüller), EP: Eritroid Progenitör (Eritrositlere dönüşen öncüller), MkpP: Megakaryosit Progenitör (Trombositlere dönüşen öncüller), GP: Granülosit Progenitör (Granülositlere dönüşen öncüller), MP: Monosit Progenitör (Monositlere dönüşen öncüller).

Lenfoid hücre dönüşümünde diğer bir önemli miRNA, miR-155'tir. miR-155'in yüksek seviyeleri, aktif B ve T lenfositlerde ve aktif monositlerde bulunur (73).

miR-155, sitokin üretimini etkileyerek germinal merkez reaksiyonunu ve T-yardımcı hücre dönüşümünü düzenler (74).

Eritroid diferansiyasyonu ve olgunlaşması esnasında miR-221 ve miR-222 ekspresyonu baskılanır. Bu iki miRNA'nın 5' ucundaki ilk sekiz nükleotid aynıdır; bu da bu miRNA'ların aynı hedef olan KIT (hücre yüzeyi büyüme faktör reseptörü olan c-KIT (CD117) adı verilen proteini kodlayan gen) reseptörüne bağlandığını düşündürür. KIT reseptörü, hematopoetik hücrelerin çoğalmasının kontrolünde, anahtar bir faktördür. miR-221 ve miR-222'nin ekspresyonlarının azalması, olasılıkla eritroblastların ekspansiyonu ile sonuçlanan KIT ekspresyon blokajı yapar (68).

Normal eritropoez esnasında, miR-222, miR-221, miR-150 ve miR-155 ekspresyonu ilerleyici olarak azalır, miR-451 (eritroid hücrelere özgüdür), miR-144 ve miR-16 (retikülositlerde) ekspresyonu artar, miR-339 ve miR-378 ekspresyonu ise bifazik patern gösterir (75).

miRNA'lar, megakaryosit olgunlaşmasında da önemli roller üstlenir. Garzon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, in vitro ortamda, CD34+ progenitör hücrelerden megakaryositlerin diferansiyasyonu esnasında 20 miRNA'nın ekspresyonunun (miR-126, miR-106, miR-10b, miR-10a, miR-17 ve miR-20) azaldığını göstermişlerdir. (76).

Transkripsiyon faktörü RUNX1'in (AML1 proteini olarak da bilinir), erken hematopoez sırasında miktarı artar ve miR-27a'nın ekspresyonunu artırır. Megakaryositik serinin dönüşümü esnasında miR-27a, RUNX1 ekspresyonunu geri besleme ile negatif yönde düzenler (77).

1.4.6. Normal hematopoezden malign hematopoeze miRNA'lar

Günümüzde, hematolojik malignitelerde miRNA'ların direk rollerini işaret eden çok az sayıda çalışma olmakla beraber, normal hematopoezde ve hematolojik malignitelerde miRNA'ların rollerini araştıran çalışmaların sayısı gitgide artmaktadır. Örneğin; miR-155, germinal merkez reaksiyonlarını düzenler ve sıçanlarda B hücreli malignensilerle ilişkili bulunmuştur (74,78). Ek olarak miR-155 ekspresyonunun diffüz büyük B hücreli lenfomada, kronik lenfositik lösemide, hodgkin lenfomada artmasının, bu miRNA'nın lenfomageneziste önemli bir rol üstlendiğini işaret eder (79,80). Diğer yandan, sıçanlarda aşırı ekspresyonunun

miyeloproliferatif hastalık (MPH) ile sonuçlandığı ve eritroid/megakaryositik seride azalma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu verilere göre miR-155, çeşitli şekillerde etkindir, aşırı salınımı ise, miyeloid ve lenfoid malignitelerle ilişkilidir (81).

1.4.7. miRNA ve kanser

Calin ve çalışma arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları moleküler çalışma, miRNA'ların kanserleşme sürecine katkıda bulduklarının ilk kanıtıdır. Yaptıkları çalışmaya göre; KLL hastalarında delesyona uğrayan 13q14 bölgesinde miR-16-1 ve miR-15a miRNA'larının bulunduğu tespit edilmiştir (20). miRNA'ların kanser ve normal dokulardaki ifade farklılıklarının tespit edilmesi ve kromozomların fragil bölgelerinde (kansere ilişkili olduğu bilinen bölgeler) bulunması (fragil bölgelerin yarısından fazlası miRNA kodlayan genlerden oluşmaktadır) miRNA'ların kanser gelişimindeki rollerini güçlendirmiştir (82).

Michael ve çalışma arkadaşları 2003 yılında normal dokuları ve solid tümörleri karşılaştırarak miRNA ifadelerinde değişimler saptadıklarını belirtmişlerdir (83). miRNA ifadelerindeki bu değişimler daha sonraki yıllarda; meme kanserinde (84), Burkitt Lenfomada (85), habis beyin tümörlerinde (86), tiroid kanserinde (87), prostat kanserinde (88), akciğer kanserinde (89), hepatosellüler karsinomda (90), mesane ve kolon kanserinde (91) tanımlanmıştır.

Kanser gelişimi ile ilişkili genler tümör baskılayıcı genler ve onkogen olarak adlandırılırlar. Protein kodlayan genlerde olduğu gibi kanserde etkili olan miRNA'lar da onkogenik miRNA (onkomiR) ve tümör baskılayıcı (TS-miR) miRNA'lar olarak ikiye ayrılır (53). OnkomiR'ler (örn: miR-17-92 ailesi) tümör baskılayıcı genleri, hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden genleri baskılayarak tümör gelişimini artırırken; TS-miR'ler (örn: let-7) onkogenik genleri baskılayarak tümör gelişimine engel olurlar (92).

1.4.8. miRNA ve lösemi

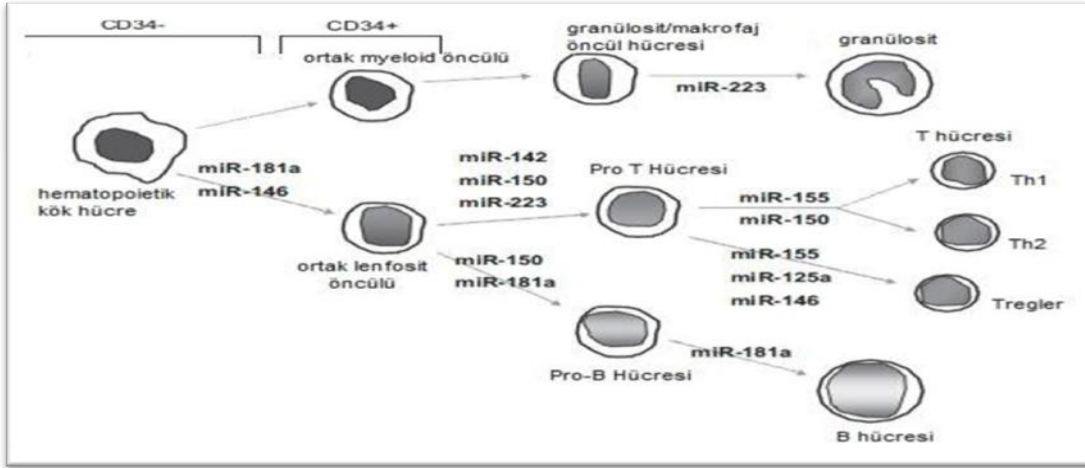
Daha önceki lösemi çalışmalarında miRNA gen anlatım profillerinin malin ve normal hücrelerde farklılık gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca miRNA anlatım profillerinin lösemi alt tipleri arasında da ayırım yapılmasına yardımcı olabileceği

gösterilmiştir (93). Örneğin, 2007 nin sonlarına doğru en sık rastalanan çocukluk çağı kanserlerinden Akut Lenfoblastik Löseminin (ALL), Akut Myeloid Lösemiden (AML) %95'lik bir oranla miRNA anlatım profillerine bakılarak ayırt edilebileceği gösterilmiştir (94). Lösemi oluşumunda yer alan miRNA'lar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 1**) (95-102).

Tablo 1: Lösemi Oluşumunda yer alan miRNA'lar (95-102).

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

Bütün bunların yanısıra hematopozde hücrelerin farklı gelişim aşamalarında farklı miRNA'ların aktif olduğu bilinmekte ve miRNA profillerine bakılarak hücreler gelişim basamaklarına göre sınıflandırılabilir. Hematopoetik sistem spesifik miRNA'lar örneğin; miR-146, miR-181, miR-223, miR-150, miR-155 ve miR-21 dir. Bu miRNA'lar granülositlerden, T ve B hücrelerine kadar farklı hematopoetik sistem hücrelerinin gelişim evrelerinde yer almaktadırlar ve hastalık patogenezinin anlatımlarının bozulması sonucu hedef genlerinin de düzenlenmelerini bozmalarıyla katkıda buldukları bilinmektedir (103) (**Şekil 14**).



Şekil 14: Hematopoezin farklı basamaklarında yer alan miRNA'lar (103)

Lösemi, kemik iliğinden henüz olgunlaşmamış hücrelerin klonal olarak çoğaldığı, tedaviye dirençli ve hastaların takip edilebileceği özgün moleküler belirteçlerin halen bulunmadığı bir hastalık grubudur. Bu küçük moleküllerin, "miRNA"ların, gen regülasyonundaki etkilerinin ve doku spesifik miRNA'ların keşfi ile yeni biyobelirteç olma potansiyelleri yüksektir. Ayrıca terapötik olarak ta onkogenik miRNA'lar anti-mir-oligoları ile susturularak veya tümör süpressör miRNA'lar doğrudan öncül veya malign kök hücrelere ya da vücuda enjekte edilerek klasik lösemi tedavileriyle kombine olarak kullanılması hedeflenmektedir (104).

1.4.9. miRNA 148b

miR-148b, miR-148/152 ailesinin bir üyesidir (105). miR-148/152 ailesinin matür üyeleri 6-7 nükleotid uzunluğu ortak olmak üzere 21-22 nükleotid uzunluğunda bir diziyeye sahiptirler. Bu ortak nükleotid dizisi hedef mRNA'ya bağlanmada en önemli bölgedir. miRNA-148/152 ailesi üyeleri hedef mRNA'ların 3'-UTR ucuna bağlanarak hem normal dokuda hem de tümöral dokuda, çeşitli biyolojik olaylarla ilişkilidirler (106) (**Tablo 2**).

Tablo 2: miR 148/152 ailesi baz dizilimi (olgun formları) (106).

Adı	Baz Dizilimi
miR-148a	ucagugc <u>ac</u> acagaacuuugu
miR-148b	ucagugc <u>aug</u> acagaacuuugg
miR-152	ucagugc <u>ac</u> acagaacuuugu

Özellikle kök hücreler olmak üzere normal dokuda anormal ekspresyonları izlenmiştir. Hematopoetik kök hücrelerde miR-148a düzeyi azalmış olarak bulunmuştur. miR-148a embriyonik kök hücreler ile karşılaştırıldığında mezenkimal kök hücrelerde baskılandığı izlenmiştir (107). Schoomeesters ve arkadaşları erken osteojenik gelişim esnasında insan mezenkimal hücrelerinde miR-148b düzeylerinin ifadesinin arttığını bildirmişlerdir (108).

Hodgkin dışı lenfomada radyasyon tedavisine yanıt veren hücrelerde miR-148b düzeyi yüksek bulunmuştur. Ayrıca miR-148b'nin radyosensitiviteyi arttırdığı ve iyonize radyasyona duyarlılıkta bu hasta grubunda bir belirteç olabileceği önerilmiştir (109).

miRNA-148a/152 ailesi üyelerinin birçok hastalıkta düzeyleri artmıştır. Multipl myelomada mir-148a'yı da içeren altı miRNA düzeyi artmış olarak bulunmuş olup bu artış kısa hastaliksız sağkalım ile ilişkili bulunmuştur (110).

miRNA-148a/152 ailesi üyelerinin çeşitli tümör tiplerinde düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durumun potansiyel olarak bu miRNA'ların tümör baskılayıcı miRNA olarak ta rol oynayabildiklerini gösterdiği ileri sürülmüştür. miR-148b'nin karaciğer kanser kök hücrelerinde ve ayrıca karaciğer kanser hücre dizilerinde ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (111, 112).

1.4.10. miRNA 150

miR-150 hematopoez de önemli bir miRNA'dır. Özellikle dinlenme halindeki T ve B hücrelerinden daha az oranda da progenitor hücrelerden eksprese olur. Kemirgen hematopoetik dokusunda B ve T hücre maturasyonunda ekspresyonu artarken immatür T hücrelerinin Th1 ve Th2 hücrelerinin ileri farklılaşma süreçlerinde yapımı baskılanarak azalır (72).

Hematopoetik kök hücre öncüllerinde mir-150'nin ektopik ekspresyonu; dolaşımdaki, dalaktaki ve lenf nodlarındaki olgun B hücre sayısını azaltırken, T hücre veya myeloid hücreler üzerine etkisi daha azdır. İleri araştırmalar sonucu B hücre maturasyonu sırasında miR-150'nin pro-B hücrenin pre-B hücreye dönüşümünü bloke ettiği kanıtlanmıştır (67).

1.4.11. miRNA 130b

miR-130 ailesi, ortak bir sekansı paylaşan miR-130b, miR-301a ve miR-301b'den oluşur. miR-130b 22q11 gen bölgesinde yer alır (113), gastrik, karaciğer ve endometrial kanserlerde onkojenik rol oynamaktadır (114-116). Yumurtalık kanseri ve tiroid papiller karsinomada ise bir tümör baskılayıcı olarak görev yapar (117, 118). miR-130, mezenkimal farklılaşma, immün hücre fonksiyonu ve hipoksik yanıt modülasyonu ile bağlantılıdır (119,120). İnvaziv gastrik, hepatosellüler ve renal karsinomda aşırı ekspresyonu olan miR-130b diğer miRNA'lar ile birlikte tümör invazyonunda bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (121-124).

1.4.12. miRNA 10a

miR-10 öncül gen ailesi, 17. kromozomda yer alan, kısa, kodlama yapmayan RNA'ların bir grubunu kodlar. Sırasıyla miR-10a, miR-10b, miR-99a / b, miR-100 ve miR-125' den oluşur. miR-10 gen ailesi, regülasyonu, korunmuş olması, Hox geni gelişim düzenleyicileri ile ortak ifade edilmesi ve genomik lokalizasyonu nedenlerinden dolayı birçok araştırma grubunun ilgisini çekmiştir. Çeşitli kanıtlar Hox geni ve miR-10 gen ailesi üyelerinin düzenlenmesi arasında yakın bir etkileşime işaret etmektedir. Drosophila'da, hem 3' miR-10, hem de daha az olan 5' miR-10, Antennapedia Hox kümesinde bulunan miR-10 geninden eksprese edilir ve her ikisi de Hox genlerini hedefler (125-127).

Günümüzde, miRNA'ların kanserde önemli roller oynadığı ve bu nedenle de miR-10a/b'nin de çeşitli kanser türlerinde gen ifadelerinin düzensiz olduğu bilinmektedir. miR-10b normal B-hücreli kronik lenfositik lösemide aşırı eksprese olur (128). Nükleofosmin (NPM1) genindeki mutasyonlar ile karakterize edilen akut miyeloid lösemilerin bir alt grubunda, miR-10a, miR-10b ve miR-100 en fazla eksprese edilen miRNA'lar olarak tanımlanmıştır (129). Ayrıca, yüksek seviyelerde miR-99a ve miR-100'ün, akut miyeloid lösemide en sık karşılaşılan anormalliklerden biri olan kromozom 16'nın inversiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (130).

1.5. KML' de Kullanılan Tanı Yöntemleri

1.5.1. Konvansiyonel sitogenetik yöntem

Laboratuvar ve klinik bulguları ile KML'den şüphelenildiği durumlarda tanı, periferik kan yayması ve kemik iliğinin incelenmesine dayanır. Periferik kanda granülositik lokösitoz, splenomegali, kemik iliğinde miyeloid hiperplazi ve LAP yayması sonucunda düşüklük gibi bulgular KML lehine olmakla birlikte kesin tanı için karyotip analizi yoluyla Ph kromozomunun ya da moleküler yöntemlerle Bcr-Abl translokasyonun gösterilmesi gerekir (131).

Ökaryotlarda nükleusta bulunan ve kalıtsal bilgiyi taşıyan DNA molekülü, hücre interfaz aşamasında iken, histon ve histon olmayan proteinlerle birlikte kromatin yapıyı oluşturur. Hücre bölünürken kromatin yapı kısalıp kalınlaşarak kromozomları meydana getirir. Kromozomlar metafaz safhasında incelemeye uygun hale gelirler (132,133).

Kromozomların anomalilerinin belirlenebilmesi ve yapısal olarak incelenmesi için yapılan işlem karyotiplemedir. Sitogenetik, kromozomların fonksiyonlarını, yapısını, davranışlarını ve patolojilerini inceleyen bilim dalıdır. Geniş bir uygulama alanı bulunsa da sitogenetik analizini gerektiren koşullar olmalıdır. Karyotipleme, tanı ve takibinde belirleyici kromozom anomalilerinin görüldüğü kanserler, özellikle hematolojik kanserlerin belirlenmesi için uygulanmaktadır (133-135).

Kromozomları tanımlamak, kromozomlarda meydana gelen sayısal ve yapısal anomalileri tespit etmek amacıyla çeşitli kromozom bantlama yöntemleri geliştirilmiştir. Genel olarak incelemelerde 450-550 band düzeyindeki metafazlar kullanılmaktadır. Band rezolüsyonu, X kromozomunu içeren bir haploid sette görülen açık ve koyu renk bölgelerin toplam sayısını ifade etmektedir. Band düzeyleri, küçük kromozom parçalarının kayıp ve artışlarının saptanmasında yeterli olmayabilir. Bu durumda daha yüksek band seviyelerinde (550-850) inceleme yapılması gerekmektedir. Amaca yönelik olarak Q, R, C, HRB gibi yöntemler de kullanılmasına rağmen, genel olarak G bantlama yöntemiyle inceleme yapılır.

KML tanısı, Ph kromozomu veya Bcr-Abl füzyon transkriptinin varlığının gösterilmesi ile doğrulanmaktadır. Ph kromozomunun varlığı konvansiyonel

sitogenetik yöntem olan G-bantlama metodu ile gösterilmektedir. Materyal olarak genellikle kemik iliği kullanılmaktadır.

Bu yöntemde hücreler siklusun metafaz evresinde incelenir. Genellikle 20 mitotik hücrenin genetik analizi yapıldığından dolayı sensitivitesi düşüktür. (133, 136,137).

1.5.2. Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH)

Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH), nükleik asit problemlerinin kromozom veya hücresel preparatlarındaki RNA ya da denatüre edilmiş DNA ile hibridizasyonuna dayanan bir tekniktir. İlk olarak 1991 yılında tanımlanmıştır. FISH yöntemi, prob adı verilen hedef DNA ya da RNA molekülüne komplementer, radyoaktif ya da nonradyoaktif olarak işaretlenmiş olan nükleik asidin, sitolojik preparatlar üzerinde hedef dizi ile olan hibridizasyonuna dayanmaktadır (138,139).

Normal koşullarda stabil olan DNA'nın çift sarmal yapısı, ısı veya formamid gibi kimyasal maddelerle etkileşimi sonucu bozulmakta ve bazlar arasındaki hidrojen bağları koparak DNA tek iplikli hale gelmektedir. Bu etkileşim ortadan kalktığında DNA çift sarmal hale gelir (140).

FISH yönteminde, belirli bir DNA kesiminin ya da kromozomal bölgenin görünür hale gelebilmesi için; ilgili bölgeye spesifik problemler kullanılması gerekmektedir. "Prob" hedef DNA ya da RNA molekülüne komplementer işaretli nükleik asit dizisidir. Problemler farklı şekillerde işaretlenmiş olabilirler (enzimler, florokromlar veya koloidal altın gibi) (141).

Aranan anomalinin doğru bir şekilde tespit edilebilmesi için amaca uygun prob seçimi çok önemlidir. Problemler; hedef bölgelerine ve sinyal paternlerine göre; Lokusa özgü problemler, tekrarlayan dizilerden oluşan problemler, telomerik problemler, kromozomun tümünü veya belirli bir bölgesini boyayan problemler gruplara ayrılmıştır. Hedef bölgelerine göre dört sınıfta toplanır (**Şekil 15**) (141, 142).



Şekil 15: FISH yönteminde kullanılan prob çeşitleri (141, 142)

1.5.3. Moleküler genetik yöntemler

KML tanısı için kullanılan moleküler genetik analizler Bcr-Abl füzyon transkriptinin gösterilmesine odaklanmaktadır (143). PCR (Polimerase Chain Reaction\Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniği, moleküler genetik yöntemler arasında bulunan, çok küçük miktardaki DNA'nın kullanımına imkan veren ve oldukça hassas olduğu için fazlaca tercih edilen bir tekniktir. PCR tekniği ile bir DNA karışımında bulunan belirli bir DNA dizisinin in vitro koşullarda hızlı ve etkin bir şekilde çoğaltılmasına imkan sağlanarak çalışmalar için uygun sayıda kopya elde edilmektedir (144).

Revers Transkriptaz (RT) PCR, PCR'in çeşitli uygulama tiplerinden biridir ve özellikle kromozom translokasyonları için kullanılmaktadır. Çalışılacak materyalden mRNA izole edilmekte ve bu mRNA'dan revers transkriptaz yardımıyla cDNA elde edilmektedir. Elde edilen cDNA, RT-PCR için kalıp görevi görmektedir. Real-Time-PCR yönteminin, füzyon genlerinin ifade ettiği transkriptlerin belirlenmesinde; moleküler sitogenetik ve konvansiyonel sitogenek yöntemlerine göre üstün yönleri vardır. Real-Time-PCR yönteminde, 1 milyon hücreden bir tanesindeki değişimi bile belirleme imkanı vardır (138,144,145).

1.5.3.1. Real-Time PCR

Real-Tme-PCR, çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan ve tek bir tüpte DNA'nın veya RNA'nın (Komplementer DNA üzerinden) çoğaltımını ve ürünlerini tespit etmeyi mümkün kılan popüler bir yöntemdir (159). Bu yöntemle konvansiyonel PCR ve gen analizleri birleştirilmiştir. PCR ürünlerinin görünür hale getirildiği, monitörize edilebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanılabildiği

ve oluşan floresanın çoğalan DNA miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı bir yöntemdir. “Kinetik PCR”, “kantitatif Real-time PCR” ve “homojen PCR” gibi isimleri vardır. (146,147).

Real-Time PCR en çok mRNA ekspresyonunu sayısal değerlere dönüştürme ve biyolojik örnekler için DNA kopya sayılarını sayısal değerlere dönüştürme alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca patojen belirleme, metilasyon tespiti, tek nokta mutasyonlarını belirleme, DNA hasarı belirleme, SNP analizi, kromozom bozukluklarının tespiti gibi kullanım alanları da vardır (148).

Real-Time PCR yönteminde, en basit metot sadece çift zincirli DNA’ya bağlanabilen “SYBR-Green I” floresan boya metodudur. Bu metot çok iyi işlemesine rağmen ortamda herhangi bir çift zincirli molekül bulunduğunda (primer-dimer oluşumu gibi) floresan ışımaya yapabilir. Real-Time PCR yönteminde, bu probdan başka, yine floresan ışımaya yapabilen, “TaqMan® probe” veya hidroliz prob, moleküler boncuk yöntemi ve hibridizasyon problemleri gibi problemler de kullanılabilir (149).

KML’nin tanısında ve tedavi takibinde kullanılan konvansiyonel sitogenetik, FISH ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması **Tablo 3**’te gösterilmektedir (150).

Tablo 3: Konvansiyonel sitogenetik, FISH ve moleküler yöntemlerin karşılaştırılması (150). (**FISH:** Floresan In Situ Hibridizasyon, **QR-PCR:** Kantitatif Real Time-PCR)

Parametre	Konvansiyonel Sitogenetik	FISH	QR-PCR
Hassasiyet, % Tümör	% 5-10	% 1-10	0,001-0,01
Ölçümün Doğruluğu	± % 15	± % 2,5	± % 2,5 kat
Metafaz	Gerekli	Gerekmiyor	Gerekmiyor
Kemik İliği(Kİ)	Gerekli	Gerekmiyor	Gerekmiyor
Kan/Kİ Örneklerinin sonuçlarının karşılaştırılması	Bildirilmemiş	Var	Var
Yanlış Negatiflik	Var	Var	Var
Yanlış Pozitiflik	Nadir	Var, ≤ % 10	Var, ≤ % 0,1
Diğer Krz. Anomalilerinin Tespiti	Var	Yok	Yok
Derivatif 9. Krz. Tespiti	Yok	Var	Yok

GEREÇ ve YÖNTEM

1.6. Gereç

1.6.1. Materyal

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 12.01.2017 tarih ve 10 sayılı kararı ile onaylanan ve Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **TIP.17.005** No' lu proje olarak desteklenen bu tez çalışmasına Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Hematoloji polikliniği veya kliniğine başvuran yeni tanı almış veya KML tanısıyla izlenmekte olan, 18 yaş üstü, bay ya da bayan 75 hasta ve hiçbir sağlık problemi olmayan 25 sağlıklı birey kontrol grubu olarak dahil edilmiştir.

Materyaller 07.04.2017 ile 16.01.2018 tarihleri arasında alınmıştır. Onayı alınmış olgulardan alınan materyallerden çalışmamızı hasta ve kontrol grubu olmak üzere iki grup olarak yaptık. Hasta grubunu da kendi içinde olmak üzere üç gruba ayırdık; yeni tanı almış, tedavilerine yanıt alınmış ve tedavilerine direnç gelişen (tedaviye yanıtız) hastalar. Böylece 25'er kişiden oluşan dört grup oluşturduk; 25 kişilik sağlıklı grup, 25 kişilik yeni tanı almış hasta grubu, 25 kişilik tedavilerine yanıt alınmış hasta grubu ve 25 kişilik tedavilerine yanıt alınmamış yani ilaç direnci gelişmiş hasta grubu. Yeni tanı grubu için Bcr-Abl sonucu pozitif olan ve 18 yaş üstü olan hastaları çalışmaya dahil ettik, Bcr-Abl sonucu negatif ve 18 yaş altı olan hastaları çalışma dışı bıraktık. Tedaviye yanıtız grup için KML tedavilerinin 12. ayında Bcr-Abl değerleri $\leq 0,1$ ve 18 yaş üstü olan hastaları dahil ettik. Tedaviye yanıtız grup için KML tedavilerinin 12. ayında Bcr-Abl değerleri >1 olan ve 18 yaş üstü hastaları dahil ettik.

Onayı alınmış olguların materyallerinden Bcr-Abl miktarları ve miRNA ekspresyonları Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Hematoloji Laboratuvarı'nda Real Time PCR yöntemi kullanılarak incelendi. Çalışma için hastalardan ve kontrol grubundan Bcr-Abl ve miRNA çalışmaları için iki tüp EDTA'lı kan (10 cc'lik iki tüp) alındı. Bcr-Abl çalışması için mRNA izolasyonu,

miRNA çalışması için miRNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

1.6.2. Kullanılan cihazlar

- Otomatik pipetler (Thermo pipet seti)
- Çeker ocak (Güçtay)
- Buzdolabı ve derin dondurucular (+4°C, -20°C, -80°C) (Safirel, Uğur, New Brunswick)
- Soğutmalı santrifüj (Beckman)
- Soğutmalı santrifüj (Hermle)
- Real-Time PCR Cihazı (Rotor-Gene, Qiagen Hilden, Germany)
- Vorteks (Biosan, FVL-2400v)
- Spektrofotometre (Nanodrop-Maestro)
- PCR Kabini (Aura PCR)
- İnhibitör (Jencons)
- Isıtıcı Blok (Wealtec)
- Thermal Cycler (PCR) (LabCycler Gradient, Made in Germany by SensoQuest GmbH)

1.6.3. Kullanılan kitler ve kimyasallar

- RBC Lysis Solution (Qiagen Sciences, Maryland, USA)
- QiAmp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Qiagen Strasse, Hilden, Germany)
- Ethanol (%99,9- %70) (Sigma-Aldrich)
- Kloroform (Sigma-Aldrich)
- 2-Merkaptoethanol (Merck)
- İpsogen RT Kit (Qiagen GmbH, Qiagen Strasse, Hilden, Germany)
- Ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (Qiagen GmbH, Qiagen Strasse, Hilden, Germany)
- miRNeasy Serum/Plasma Kit (50) (Hilden, Almanya)
- Qiazol Lysis Reagent (Hilden, Germany)

- Qiagen miScript II Reverse Transcription Kit II (Hilden, Germany)
- Qiagen miScript Primer Assay (Hilden, Germany)
- miScript PreAMP PCR Kit (Hilden, Germany)
- Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti (Hilden, Germany)

1.7. Yöntem

1.7.1. Bcr-Abl miktarları için örneklerden RT-PCR analizinin yapılması

1.7.1.1. Kandan lökosit eldesi

RBC Lysis Solution ve QiAmp RNA Blood Mini Kit kullanılarak lökosit eldesi ve RNA izolasyonu yapıldı. **Buffer RPE** konsantre olarak bulunmaktadır. İlk kullanımdan önce 4 kat Ethanol (% 96-100) eklendi. **Buffer RLT** içerisinde presipitatlar oluşabilir. Kullanımdan önce 37 °C'ye ısıtılarak çözüldü. **2-Merkaptoetanol (β-ME)** izolasyondan önce **Buffer RLT** içerisine eklendi. **1 ml RLT** içerisine **10µl β-ME** eklendi (Bu solusyon oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir.) Eritrositlerin lysis işlemleri soğuk blokta, daha sonraki işlemler oda sıcaklığında olabildiğince çabuk yapıldı. **6.** basamağa kadar tüm santrifüj işlemleri **+4°C**'de diğerleri oda sıcaklığında gerçekleştirildi. (İzolasyona alınacak toplam lökosit sayısı **10⁷** olacak şekilde kan miktarı ayarlandı).

1. **Bir hacim** periferik kan üzerine **5 hacim Buffer EL** eklendi.
2. Buz üzerinde **15 dakika (dk)** bekletildi, arada **2 kez** hafifçe altüst edilerek karıştırıldı.
3. **400 g'de 10 dk, 4° C' de** santrifüj edildi, süpernatant tamamen alındı. Pellet beyaz küreleri içerir, hafif pembe renkliyse bir sonraki yıkamada geçecektir.
4. Kan miktarının **2 hacim katı** kadar **Buffer EL** eklendi, vorteks edilerek hücrelerin çözülmesi sağlandı. Pellet kırmızı görünüyorsa **5-10 dk** buzda bekletilir.
5. **400g'de 10dk, 4°C**'de santrifüj edildi, süpernatant tamamen alındı. Çökelen beyaz kürelerin üzerinde kalan sıvı pipetle toplanarak tamamen uzaklaşması sağlandı. (Eritrosit artıkları kalırsa RNA' nın kolona bağlanmasını etkileyebilir).

6. Çökelen beyaz kürelerin üzerine **Buffer RLT+ β -ME** karışımı eklendi. (İzolasyona başlarken aldığımız kan miktarı **500 μ l**' nin altında ise **350 μ l Buffer RLT+ β -ME** karışımı, kan miktarı **500-1500 μ l** arasında ise **600 μ l Buffer RLT+ β -ME** karışımı eklenir). (Lizat tamamen homojen olmalıdır, beyaz küreler parçalanıp lizat sıvılaşıncaya kadar pipetle karıştırıldı).
7. QIA shredder (lila renkli) kolona lizat tek seferde yüklendi, **3 dk, 13 000 rpm**'de oda sıcaklığında santrifüj edildi, kolon atılıp, lizat RNA izolasyonu yapılana kadar **-20°C**'de saklandı.

1.7.1.2. Lökositlerden RNA eldesi

1. **-20°C**' den çıkardığımız hücrelere (lizata) **buffer RLT+ β -ME** karışımı kadar (350 / 600 μ l) **70% etanol** eklendi ve pipetle karıştırıldı ve spin kolona (beyaz) alındı (600 μ l lizat ve 600 μ l etanol eklendi ise iki kez yükleme yapılır).
2. Beyaz spin kolonun ortasına dikkatlice yüklenen lizat ve etanol karışımı, **1 dk, 10 000 rpm**'de santrifüj edildi. (Hacim 700 μ l' yi geçerse aynı kolona tekrar yüklenir).
3. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alındı, **700 μ l Buffer RWI** eklendi, **1 dk, 10 000 rpm**' de santrifüj edildi.
4. Kolon yeni bir 2 ml tüpe alındı, **500 μ l Buffer RPE** eklendi, **1 dk, 10 000 rpm**' de santrifüj edildi (Kolonun içerisine geri etanol kaçmaması için santrifüjden çıkartılırken çok dikkatli olunur).
5. Tekrar **500 μ l Buffer RPE** eklenir, **14 000 rpm**' de **4 dk** santrifüj edildi (Kolonun içerisine etanol geri kaçmaması için santrifüjden çıkartılırken çok dikkatli olunur).
6. Etanolün tamamen uzaklaştırılması için kolon yeni bir 2 ml tüpe yerleştirildi, **14 000 rpm**' de **2 dk** santrifüj edildi.
7. QIAamp spin kolon (filtreli tüp) 1.5 ml'lik eppendorf tüpe yerleştirildi, **40 μ l RNase free-H₂O** ortaya gelecek şekilde eklendi, **2 dk, 10 000 rpm**' de santrifüj edildi.
8. Filtreli tüp atıldı. Alttaki eppendorf tüpte bulunan RNA **-80°C**' ye kaldırıldı

1.7.1.3. mRNA' dan cDNA (kalıp, komplementer DNA) eldesi

cDNA eldesi için kullanılan kit (İpsogen RT Kit) içeriği (RNase İnhibitör ve Reverse Transcriptase dışında) soğuk blok (+4°C de) üzerinde çözüldü, kısaca santrifuj edildi. RNase İnhibitör ve Reverse Transcriptase, kullanılacağı zaman buz üzerine çıkartıldı. RNA örnekleri 65°C de 5 dakika inkübasyondan sonra hemen buz üzerine alındı. (Hasta örneklerinden 10'ar µl RNA 0,2' lik tüplere alındı, 65°C'de 5 dakika inkübasyonda bırakıldı). **Tablo 4'** e göre miks hazırlandı. 1 adet 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne her çalışma grubu için aşağıdaki değerler kullanılarak miks hazırlandı (Bcr-Abl için kit içerisinde bulunan MMR-IS Calibrator RNA ve High Positive Control RNA numunelerinin cDNA sentezi de gerçekleştirildi) (25 örnek+IS+HP RNA+ 1 pipetaj için= 28 reaksiyon).

Tablo 4: mRNA' dan cDNA oluşturmak için miks hazırlama tablosu

cDNA için kullanılan bileşenler	(µl)	X reaksiyon sayısı	miks (µl)
1) 5X Buffer/ Tampon	5	28	140
2) dNTP	2	28	56
3) Random Primer	5,25	28	147
4) DTT	1,25	28	35
5) RNase İnhibitör	0,5	28	14
6) Reverse Transcriptase	1	28	28
Toplam	15	28	420

Hazırlanan miks iyice pipetaj yapıldı ve daha önce inkübasyona bırakılan hasta RNA'ların üzerine 15 µl olarak dağıtıldı. Pipetaj yapılarak PCR cihazına konuldu. **Tablo 5'** teki PCR protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar daha sonra Real Time PCR'da kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Tablo 5: mRNA'dan cDNA oluşturmak için Thermal Cycler Protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)	Adı
25	10	Revers Transkripsiyon1
50	60	Revers Transkripsiyon 2
85	5	İnaktivasyon
4	5	Soğutma

1.7.1.4. Bcr-abl için Real-Time PCR aşaması

cDNA eldesi tamamlandıktan sonra mRNA'ların ekspresyon düzeylerine bakmak için RT-PCR aşamasına geçildi. **Tablo 6**'da hazırlanan bileşenlerin tepkime hacimleri verilmiştir (Bcr-Abl ve Abl (Housekeeping gen) için birer mix hazırlandı).

Başlamadan Önce; Kit (Ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit) içerisinde bulunan MMR-IS Calibrator RNA ve High Positive Control RNA numunelerinin cDNA sentezi gerçekleştirildi. BCR-ABL ve ABL PPM tüpleri oda sıcaklığına getirilerek eritildi. Kısaca vorteks edilip, spin santrifüj yapıldı. Standart kontroller oda sıcaklığına getirilip eritildi; iyice vorteksledikten sonra kısaca spin santrifüj yapıldı. SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6 tüpleri BCR-ABL standartları olarak, SP3, SP4, SP5 ve SP6 tüpleri de ABL standartları olarak kullanıldı. (Standartlar, PCR miksinin ve örneklerin dağıtıldığı alandan tamamen farklı bir alanda dağıtıldı.) Hem Majör Bcr-Abl hem de ABL miksi için hastalardan sonra “no template control” yüklendi.

Tablo 6: Bcr-Abl için Real Time PCR bileşenlerinin tepkime hacimleri.

	Majör Bcr-Abl Miksi			ABL Miksi		
	Miktar (µl)	X Örnek Sayısı	Toplam Miktar (µl)	Miktar (µl)	X Örnek Sayısı	Toplam Miktar (µl)
Takara PCR Miks	12,5	34	425	12,5	33	412.5
PPF-Mbcr (Primer-Probe karışımı-Füzyon Gen) (Majör miksi) PPC-ABL ((Primer-Probe karışımı-Kontrol) (ABL miksi)	1	34	34	1	33	33
H ₂ O	6,5	34	221	6,5	33	214.5
Toplam	20	34	680	20	33	660

(Bcr-Abl mixi: 25 örnek+ 5 Std + NC+IS+HP RNA+1 pipetaj=34, ABL mixi: 25 örnek+4 Std+NC+IS+HP RNA+1 Pipetaj=33)

Hazırlanan mix'ler ilgili tüplere 20 µl olarak dağıtıldı, üzerlerine 5µl cDNA'lardan eklenip Real-Time PCR cihazına yüklendi ve **Tablo 7'** de belirtilen protokol yüklendikten sonra cihaz çalıştırıldı.

Tablo 7: Bcr-abl için Real Time PCR tepkime koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Adı	
95	15 sn	Hold 1	
95	5 sn	50 döngü	Cycling
60	30 sn		
36	1 dk	Hold 2	

1.7.1. miRNA Düzeyleri İçin Plazma Örneklerinden RT-PCR Analizinin Yapılması

1.7.1.1. Kandan plazma eldesi

1. **EDTA**'lı tüpe kan alındı ve oda ısısında (**15-25°C**) veya **4°C**'de saklandı. 1 saat içinde işlemlere başlandı.
2. **1900 xg** (3000 rpm) ve **4°C**' de **10 dk** santrifüj edildi.
3. Üstteki sarı plazma fazı steril iki adet eppendorf tüpe aktarıldı (Alttaki pellete dokunulmamaya dikkat edildi).
4. Plazma örnekleri **16 000xg** ve **4°C**'de **10 dk** santrifüj edildi.
5. Üstteki süpernatant dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarıldı. miRNA izlosayonu yapılana kadar **-80°C**'de saklandı.

1.7.1.2. Plazma örneklerinden miRNA eldesi

miRNA izolasyonu, miRNeasy Serum/Plasma Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit plazmadaki miRNA'lar dahil tüm RNA'ları izole etmektedir. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Plazmalar **-80°C**'den çıkarılarak **4°C**'de çözülmesi beklendi.
2. **16 000xg** ve **4°C**'de **5 dakika (dk)** santrifüj edildi ve süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı.
3. **200 µl** plazma örneği alınarak 2 ml tüpe konuldu ve üzerine **5 katı** (1000 µl) Qiazol Lysis Reagent eklenerek vortekslendi.
4. Örnekler **5 dk** oda sıcaklığında (**15-25°C**) bekletildi.
5. Herbir örneğe **3,5 µl** Spike-in kontrol çalışma solüsyonu eklendi. Örnekler vortekslenerek **2-3 dk** bekletildi.
6. Başlangıç materyali kadar (**200 µl**) kloroform eklendi. **15 saniye** boyunca iyice vortekslendi (Vortex işleminin iyi yapılmış olması faz ayrımını daha net hale getirir).
7. **2-3dk** oda sıcaklığında hafif alt üst edilerek beklendi.
8. **12 000 xg** ve **4°C**'de **15 dk** santrifüj edildi.
9. Oluşan üç fazdan üstte olanından **600 µl** alınarak yeni bir eppendorf tüpüne transfer edildi. Ara fazdan alınmamasına dikkat edildi.

10. Üzerine **900 µl %100'** lük saf etanol eklendi ve alt üst edilerek iyice karışması sağlandı.
11. Bu karışımdan **700 µl** örnek alınarak RNaz Mini kolonun içine konuldu. Kapağı kapatılarak **8000xg** ve oda sıcaklığında **15 saniye** santrifüj edildi. Örneğin tamamı bitinceye kadar bu basamak tekrarlandı.
12. **700 µl** RWT tampondan RNaz mini kolona eklendi ve **15 saniye** oda sıcaklığında **8000xg**'de santrifüj edildi.
13. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı. **500 µl** RPE tamponundan RNaz Mini kolonun üstüne eklendi ve **15 saniye** oda sıcaklığında **8000 xg**'de santrifüj edildi.
14. Toplama tüpünde kalan kısım atıldı. **500 µl**, %80 etanol RNaz Mini kolona eklendi ve **2 dk 8000xg**'de santrifüj edildi.
15. RNaz Mini kolon, yeni bir **2 ml**'lik koleksiyon (toplama) tüpüne yerleştirildi. Kolon kapakları açık bırakılarak membran kuruyana kadar **1 dk** maksimum hızda (**16 000xg**) santrifüj edildi.
16. RNaz Mini kolon, yeni bir **1,5 ml**'lik eppendorf tüpüne yerleştirildi. **14 µl** RNaz içermeyen su, spin kolonunun merkezine direkt olarak eklendi.
17. **5 dk** oda sıcaklığında beklendi ve maksimum hızda **1 dk** santrifüj edildi.
18. Elde edilen RNA'ların saflığı ve miktarı nanodrop cihazında ölçüldü.
19. Elde edilen RNA'lar Real-Time PCR aşamasına kadar **-80°C**'de saklandı.

1.7.1.3. cDNA (kalıp, komplementer DNA) eldesi

cDNA eldesi için hazır kit (Qiagen miScript II Reverse Transcription Kit II) kullanıldı. **Tablo 8**'e göre miks, buz üzerinde hazırlandı. **1 adet 0,5 ml**'lik eppendorf tüpüne 12 hasta için aşağıdaki değerler kullanılarak mix hazırlığı yapıldı.

Tablo 8: miRNA'dan cDNA elde etmek için mix hazırlığı (12 hasta için)

Bileşenler	Tepkime Hacmi ve Örnek Sayıları
5x miScript HiSpec tamponu	4 µl x 13 = 52 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	2 µl x 13 = 26 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl x 13 = 26 µl
Toplam Hacim	8 µl x 13 = 104 µl

Hazırlanan miks iyice pipetaj yapıldı ve her bir hasta için numara verilip ayrılan 0,2 ml'lik eppendorf tüplerine 8 µl olarak paylaştırıldı. Üzerlerine sırasıyla 12 µl izole edilen örnek miRNA'larından eklendi. Pipetaj yapılarak thermal cycler cihazına konuldu. **Tablo 9** 'daki PCR protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 9: miRNA'dan cDNA sentezi için Thermal Cycler protokolü

Sıcaklık (°C)	Zaman(dk)	Protokol Adı
37	60	İnkübasyon
95	5	İnaktivasyon
4	∞	Soğutma

cDNA'nın Seyreltilmesi; Sentezi gerçekleştirilen cDNA'ların her birinin içerisine 80 µl RNAze free su eklenerek seyreltme işlemi gerçekleştirildi.

1.7.1.3.1. cDNA'nın zenginleştirilmesi (Preamplifikasyon aşaması)

Çalışmada kullanılan genlere ait bilgiler **Tablo 10** 'te verilmiştir.

Tablo 10: Çalışmada kullanılan miRNA primer dizileri

No	Product No	Refseq No	Primer Adı
1	218300	MIMAT0000759	miR-148b-3p
2	218300	MIMAT0000451	miR-150-5p
3	218300	MIMAT0000691	miR-130b-3p
4	218300	MIMAT0000253	miR-10a-5p
5	218300	NR_002735	Snord 61 (housekeeping gen)

1.7.1.3.1.1. Primer havuzu oluşturma işlemi

Bu işlem için çalışmamızda kullanacağımız liyofilize haldeki 7 adet primere 550 µl su eklendi (Qiagen miScript Primer Assay). Kullanılan Primerler:

1. Snord 61
2. miR-150
3. miR-10a

İlk 5 primer (1 no'lu primer housekeeping gen) çalışmasını yapmak istediğimiz primerlerdir (miScript Primer Assays kiti).

4. miR-148b
5. miR-130b
6. miRTC miScript Primer Assay
7. Primer Ce-miR-39-1 miScript Primer Assay

6. ve 7. Primerler miScript PreAmp PCR kit kutusundan çıkmaktadır. Kontrol amacıyla kullanılmaktadır.

Toplamda 7 primerin her birinden 10µl alınıp bir eppendorf tüpünde birleştirildi. Oluşan 70 µl 'lik toplam hacmi 250 µl'ye tamamlamak için 180 µl su eklendi ve primer havuzu oluşturuldu.

cDNA'lar, miScript PreAMP PCR Kit kullanılarak zenginleştirme işlemi yapıldı (**Tablo 11**).

Tablo 11: miRNA çalışmasında cDNA'nın zenginleştirilmesi için PCR koşulları

Bileşenler	Tepkime Hacmi
5x miScript PreAMP Buffer	5 µl x 13 = 65 µl
HotStarTaq DNA Polimeraz	2 µl x 13 = 26 µl
miScript PreAMP Primer mix (pool)	5 µl x 13 = 65 µl
miScript PreAMP Universal Primer	1 µl x 13 = 13 µl
RNaz-içermeyen su	7 µl x 13 = 91 µl
Toplam Hacim	20 µl x 13 = 260 µl

0,2 ml'lik 12 adet eppendorf tüplerine hazırlanmış olan mix karışım 20 µl olarak dağıtıldı. Üzerine daha önce seyreltilmiş olduğumuz cDNA'dan 5 µl eklendi ve tekrar PCR aşaması yapıldı. cDNA zenginleştirme pcr protokolü **Tablo 12'** de verilmiştir.

Tablo 12: cDNA'nın zenginleştirilmesi için PCR koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	Protokol adı
95	15 dk	Aktivasyon
94	30 sn	Denatürasyon Eşleşme ve Sentez
60	3 dk	
} 12 döngü		

1.7.1.4. Real-Time PCR cihazında miRNA analizinin yapılması

cDNA eldesi tamamlandıktan sonra miRNA'ların ekspresyon düzeylerine bakmak için RT-PCR aşamasına geçildi. RT-PCR için tepkime bileşenleri hazır kit (Qiagen miScript SYBR Green PCR kiti) kullanılarak hazırlandı. **Tablo 13'** te bileşenlerin tepkime hacimleri verilmiştir.

Tablo 13: Real Time PCR için kullanılan bileşenlerin oranları

Bileşenler	Hacim
<u>2x Master Mix (SYBR Green PCR Master Mix)</u>	12,5 µl x 11 = 137,5 µl
<u>10x miScript Universal Primer</u>	2,5 µl x 11 = 27,5 µl
<u>10x miScript Primer Assay (Related miRNA)</u>	2,5 µl x 11 = 27,5 µl
<u>RNaz içermeyen su</u>	2,5 µl x 11 = 27,5 µl
Toplam hacim	20 µl x 11 = 220 µl

Tabloda bulunan 10x miScript Primer Assay (Related miRNA) daha önce 550 µl ile sulandırdığımız primerlerdir. 7 adet primerimiz olduğundan 7 ayrı eppendorf tüpüne PCR mixleri hazırlanırken ilgili primerden eklenir. Hazırlanan bu mixler buz üzerinde 0,1 ml' lik PCR tüplerine 20 µl olarak dağıtıldı. Üzerlerine 5 µl zenginleştirilmiş cDNA eklendi ve Real Time-PCR cihazına (Rotor-Gene, Qiagen Hilden, Germany) yüklendi (Final volum 25 µl oldu).

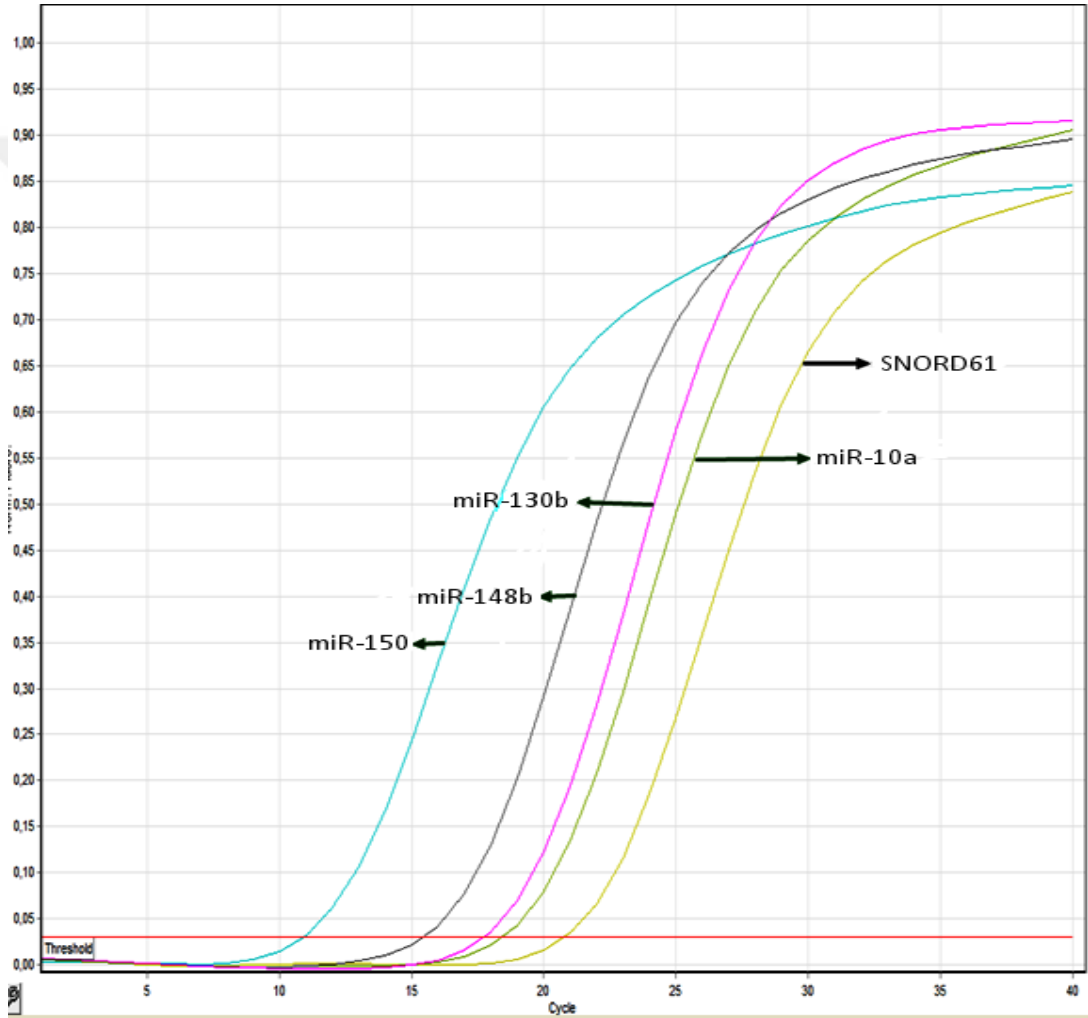
miR-150, miR10a, miR-148b, miR-130b, miR39-1(kontrol), miRTC (cDNA aşamasının kontrolü) miRNA primerleriyle beraber referans gen olarak SNORD61 (housekeeping gen) ifade düzeylerini tespit etmek için real-time PCR cihazı kullanılmıştır. **Tablo 14'** te RT-PCR tepkime koşulları verilmiştir.

Tablo 14: Real time PCR tepkime koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Protokol Adı
95	15 dk	Aktivasyon
94	15 sn	} 40 döngü Denatürasyon Eşleşme ve Sentez
55	30 sn	
70	30 sn	

Real Time-PCR cihazında miRNA çalışması bittikten sonra analiz sayfası açıldı. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra çalışmanın güvenilirliği için kontrol geni ve housekeeping geni Cycle Threshold (Ct) değerleri kontrol edildi. Aynı şekilde tüm örneklerin (hasta grupları ve kontrol grubu) analizleri yapılarak Ct değerleri tespit edildi.

Aşağıdaki şekilde ve tabloda grup1'e (yeni tanı almış hasta grubu) ait bir örneğin amplifikasyon eğrileri ve Ct değerleri gösterilmiştir (**Şekil 16, Tablo 15**).



Şekil 16: Çalışmada kullanılan miRNA genlerinin Real Time PCR cihazındaki amplifikasyon grafiği(Çoğalma eğrisi)(Yeni Tanı grubu (Grup 1) 2.hasta)

Tablo 15: Çalışmada kullanılan miRNA genlerinin Real Time PCR cihazındaki Ct değerleri (Yeni Tanı grubu 2.hasta)

Gen Sembolleri	Katalog No	Ct değerleri (Grup 1 2.Örnek)
Snord61	MS00033705	20,81
miR-150	MS00003577	10,93
miR-10a	MS00031262	18,47
miR-148b	MS00031458	15,5
miR-130b	MS00003451	17,73

1.7.1.5. miRNA analizi için istatistiksel analiz

Real-Time PCR verileri, Gen Globe Veri Analiz Merkezi (Qiagen) kullanılarak analiz edildi. $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle ham veriler, SNORD61 housekeeping geni kullanılarak normalleştirildi. Kat değişim değerleri <1 olanlar düşük olarak kabul edildi. Kat değişim değerleri >1 olanlar artmış olarak kabul edildi. Örneklerin referans gene göre normalizasyonu yapıldı. Sonuçlar Student t-testine tabi tutularak p değerleri hesaplandı. %95 güven aralığında “ $p<0,05$ ” olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Hasta grupları ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet bakımından değerlendirilmeleri One Way Anova (Tek yönlü varyans analizi) yöntemiyle yapıldı, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

BULGULAR

1.8. Hasta ve Kontrol Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi

Bu çalışmada hasta gruplarında 75 birey, kontrol grubunda 25 birey olmak üzere toplam 100 birey bulunmaktadır. Çalışmamıza katılan hasta ve kontrol bireylerin 57'si kadın, 43'ü erkektir (Toplam birey sayımız 100 olduğu için %57'si kadın, %43'ü erkek). Cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde hasta ve kontrol gruplarında bulunan kadınların yaş ortalamaları $46,53 \pm 13,94$, erkeklerin ise $53,44 \pm 17,01$ olarak hesaplanmıştır. Cinsiyetler bakımından yaş ortalamaları One Way Anova (Tek yönlü varyans analizi) yöntemi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bu çalışmaya dahil edilen hastalar 3 gruptan oluşmaktadır. Yeni tanı hasta grubu, tedaviye yanıtı hasta grubu ve tedaviye yanıtı hasta grubu. Yeni tanı hasta grubu (Grup 1) 10 erkek, 15 kadın olmak üzere toplam 25 hastadan oluşmaktadır. Yeni tanı hasta grubunun yaş ortalaması $49 \pm 16,97$ 'dir. Tedaviye yanıtı grup (Grup 2) 10 erkek, 15 kadın olmak üzere toplam 25 hastadan oluşmaktadır. Yanıtı hasta grubunun (Grup2) yaş ortalaması $48,76 \pm 14,39$ 'dur. Tedaviye yanıtı hasta grubu (Grup 3) 12 erkek, 13 kadın olmak üzere toplam 25 hastadan oluşmaktadır ve bu grubun yaş ortalaması $50,08 \pm 16,96$ 'dır. Kontrol grubu (Grup 4) ise 11 erkek, 14 kadın olmak üzere 25 bireyden oluşmaktadır. Kontrol grubunun yaş ortalaması $50,16 \pm 15$ 'tir. Grupların yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Gruplardaki yaş ortalamaları cinsiyet bakımından değerlendirildiğinde; yeni tanı hasta grubundaki kadınların yaş ortalaması $41 \pm 10,21$, erkeklerin $61 \pm 18,42$, yanıtı hasta grubundaki kadınların yaş ortalaması $48,87 \pm 11,54$, erkeklerin $48,60 \pm 18,57$, yanıtı hasta grubundaki kadınların yaş ortalaması $49 \pm 16,66$, erkeklerin $51,25 \pm 17,94$, kontrol grubundaki kadınların yaş ortalaması $47,64 \pm 16,64$, erkeklerin $53,36 \pm 12,64$ 'tür. Gruplardaki yaş ortalamaları cinsiyetler bakımından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0,05$) (**Tablo 16**).

Tablo 16: Cinsiyetlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait yaş ortalamalarının değerlendirilmesi (N=Birey Sayısı)

Çalışma Grupları	YAŞ					
	Erkek			Kadın		
	N	%	Yaş Ortalaması	N	%	Yaş Ortalaması
Yeni Tanı Grubu	10	(10)	61,00±18,42	15	(15)	41,00±10,21
Yanıtlı Grup	10	(10)	48,60±18,57	15	(15)	48,87±11,54
Yanıtsız Grup	12	(12)	51,25±17,94	13	(13)	49,00±16,66
Kontrol Grubu	11	(11)	53,36±12,64	14	(14)	47,64±16,64

1.9. Real-Time PCR Cihazında Bcr-abl Analizinin Yapılması

Çalışma bittikten sonra analiz sayfası açıldı. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra çalışmanın güvenilirliği için bazı değerler kontrol edildi. Standart eğri grafiğindeki değerler aşağıdaki gibi olmalıdır;

$R = 0,97$ ' nin üstünde, $R^2 = 0,95$ ' in üstünde, $M = -3,0$ ile $-3,9$ arasında, $E = 1$ ' e yakın olmalıdır.

Hasta Abl kopya sayılarının 10 000'nin altında olmaması gerekir. Düşük olan örneklerin çalışması tekrar edildi. Analiz sonunda % normalize kopya numarası (NCN) sütununda IS Calibratör (International Scale-Uluslararası Ölçek) değerinin 0,05- 0,30 arasında olması gerekir, sonuçlar istenilen aralıkta değilse çalışma tekrar edilir. İstenilen aralıkta olan örneklere ait kopya sayıları üretici firmaya ait eksele tablosuna aktararak analiz tamamlanır. (Çalışmada kullandığımız bcr-abl kitlerimiz 3 log azalmaya kadar olan değerleri tespit edebildiği için % IS=0,0069' un altı negatif, üstü pozitif kabul edilir). (3 log kitler; Tanı anında hastanın değeri 100 kabul edilir, tedavinin sonucunda $\leq 0,1$ olan değerler için majör moleküler yanıt alınmış kabul edilmektedir). (Majör moleküler yanıt (MMY, MY3,0): Bcr-Abl değerinin uluslararası ölçeğe (International Scale –IS) göre %0,1'den küçük ya da eşit olması).

Real-Time PCR Bcr-Abl çalışmalarında hasta grupları ve kontrol grubu için elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (**Tablo 17-20**).

Tablo 17 : Yeni tanı hasta grubuna (YT) (Grup1) ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları

(C: cinsiyet, Y: Yaş)

No	C	Y	Bcr-Abl (%)
YT1	K	45	2,6
YT2	K	40	61
YT3	E	38	0,5
YT4	K	51	53
YT5	K	33	47
YT6	E	34	0,01
YT7	E	76	69
YT8	K	38	26
YT9	K	34	65
YT10	E	73	26,2
YT11	E	60	26,9
YT12	K	39	120
YT13	K	48	75
YT14	K	28	202
YT15	K	32	94,8
YT16	K	57	57,1
YT17	K	62	17
YT18	E	44	1,1
YT19	K	37	117
YT20	E	83	125
YT21	E	84	74
YT22	E	63	122
YT23	K	27	53
YT24	E	58	0,014
YT25	E	41	126,8

Tablo 18: Tedaviye yanıtlı hasta grubuna (Y) (Grup2) ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları (C: cinsiyet, Y: Yaş)

No	C	Y	Bcr-Abl (%)
Y1	E	78	0,032
Y2	E	41	Negatif
Y3	K	27	0,03
Y4	K	40	0,03
Y5	E	35	0,024
Y6	K	41	0,007
Y7	K	48	0,04
Y8	E	33	Negatif
Y9	E	81	0,05
Y10	K	57	0,037
Y11	K	52	0,03
Y12	K	50	0,002
Y13	E	52	0,1
Y14	K	49	0,004
Y15	K	42	0,05
Y16	E	55	0,04
Y17	K	48	0,02
Y18	K	47	Negatif
Y19	K	79	Negatif
Y20	E	47	0,03
Y21	K	59	Negatif
Y22	K	54	Negatif
Y23	E	39	0,05
Y24	E	25	Negatif
Y25	K	40	0,03

Tablo 19: Tedaviye yanıtız hasta grubuna (YS) (Grup3) ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları (C: cinsiyet, Y: Yaş)

No	C	Y	Bcr-Abl (%)
YS1	E	69	3,4
YS2	E	25	1,1
YS3	K	27	20,06
YS4	E	51	7,3
YS5	K	49	9
YS6	K	43	23
YS7	K	82	52
YS8	E	26	6
YS9	K	61	8
YS10	E	52	2,8
YS11	E	84	46
YS12	K	36	10
YS13	E	52	67,12
YS14	K	49	1,3
YS15	K	26	55
YS16	K	61	84
YS17	E	77	38
YS18	K	66	2,5
YS19	E	56	2,1
YS20	K	30	1,9
YS21	E	50	3
YS22	E	55	1,1
YS23	K	50	1,26
YS24	K	67	72
YS25	E	28	2,9

Tablo 20 : Kontrol grubuna (K) ait bilgiler ve Bcr-Abl sonuçları (C:Cinsiyet, Y: Yaş)

No	C	Y	Bcr-Abl (%)
K1	E	75	Negatif
K2	E	65	Negatif
K3	E	55	Negatif
K4	E	64	Negatif
K5	E	52	Negatif
K6	E	41	Negatif
K7	E	66	Negatif
K8	E	45	Negatif
K9	E	35	Negatif
K10	E	44	Negatif
K11	K	53	Negatif
K12	K	68	Negatif
K13	K	75	Negatif
K14	K	61	Negatif
K15	K	72	Negatif
K16	K	31	Negatif
K17	K	37	Negatif
K18	K	26	Negatif
K19	K	35	Negatif
K20	K	36	Negatif
K21	K	45	Negatif
K22	K	40	Negatif
K23	K	58	Negatif
K24	K	30	Negatif
K25	E	45	Negatif

1.10. miRNA Düzeyleri için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Analizi ile Kat Değişimlerinin Hesaplanması

Real Time PCR çalışmasından sonra analiz için tüm örneklerin Ct değerleri bir eksel dosyasına aktarıldı. Oluşturulan eksel tablosu <http://www.qiagen.com/geneglobe> adresindeki veri analizi web aracına yüklendi. Numuneler; kontrol ve hasta grupları olarak sınıflandırıldı. Elde edilen Ct değerleri referans gen Ct değerlerine oranlanıp normalleştirildi. Web aracı, kat değişimi/kat düzenlenmesini hesaplamak için $\Delta\Delta Ct$ yöntemini kullanmaktadır. Kısaca, ΔCt ilk önce incelenen genler (mir150, mir10a, mir148b, mir130b) ile housekeeping geni (snord61) arasında hesaplandı. $\Delta\Delta Ct$, ΔCt (deney) değerinden ΔCt (kontrol) değeri çıkarılarak daha da belirgin hale getirildi. Daha sonra $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ formülü kullanılarak hasta ve kontrol grupları için normalizasyon yapıldı. Veri analizi raporu, GeneGlobe' deki QIAGEN web portalından aktarıldı.

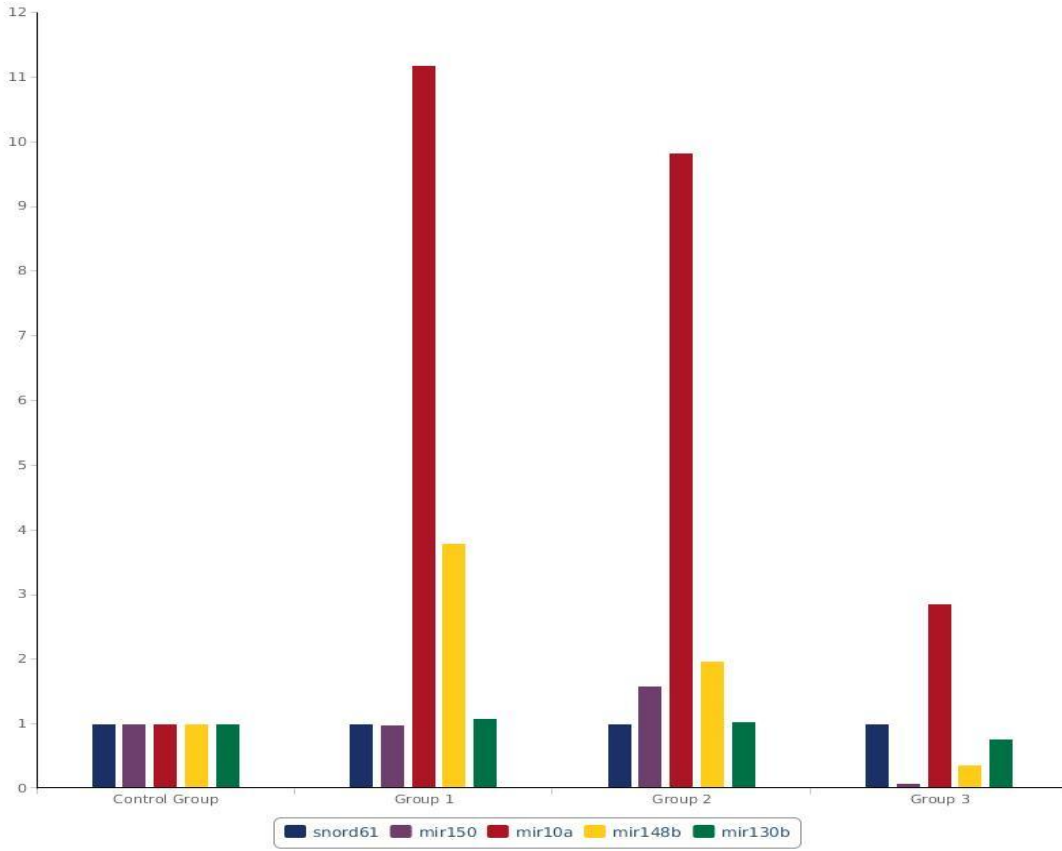
1.10.1. Kat-değişimi (Fold change)

Kat-değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$); test örneğindeki normalize gen ekspresyonunun ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), kontrol örneğindeki normalleştirilmiş gen ekspresyonuna ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) oranıdır. Kat düzenlemesi ise, kat değişimi sonuçlarının biyolojik olarak anlamlı bir şekle dönüştürülmesidir. Kat düzenlemesi (fold regulation), kat değişimi 1 ya da daha büyükse kat değişimine eşittir. Kat değişimi 1' den küçükse kat düzenlemesi “-1/ kat değişimi” formülünden hesaplanmaktadır. Kat değişim değerleri <1 olanlar azalmış olarak kabul edildi. Kat değişim değerleri >1 olanlar artmış olarak kabul edildi. Kontrol grubundaki her bir genden elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile hasta grubu arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için student t-testi kullanıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı.

1.11. Gruplara Göre miRNA Ekspresyon Düzeyleri

Hasta ve kontrol gruplarında Real Time PCR yöntemiyle miR-150, miR-10a, miR-148b, miR-130b ekspresyon düzeylerine ve housekeeping geni olarak snord61'in ekspresyon düzeyine bakıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizi ile kat değişimleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekil ve tablolarda gösterilmiştir.

Hasta gruplarının kontrol grubuna göre kat değişimleri (fold change) aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17: Hasta gruplarının kontrol grubuna göre kat değişimi (fold change) grafiği(Grup1: Yeni tanı hasta grubu, Grup 2: Tedaviye yanıtı hasta grubu, Grup 3: Tedaviye yanıtı hasta grubu)

İncelenen miRNA'ların kat değişimleri ve p-değerleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 21-24)

Tablo 21: Yeni tanı grubunun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri

Grup1 (Yeni Tanı Grubu)		
Gen Adı	Fold-Change(Kat-Değişimi)	p-Value(p-değeri)
Snord61	1,00	Housekeeping gen
miR-150	0,98	0,863306
miR-10a	11,17	0,003934
miR-148b	3,78	0,125377
miR-130b	1,08	0,617569

Tablo 22 : Tedaviye yanıtlı grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri

Grup2 (Tedaviye yanıtlı Grup)		
Gen Adı	Fold-Change(Kat-Değişimi)	p-Value(p-değeri)
Snord61	1,00	Housekeeping gen
miR-150	1,58	0,237789
miR-10a	9,82	0,000292
miR-148b	1,97	0,451892
miR-130b	1,03	0,271973

Tablo 23 : Tedaviye yanıtız grubun kontrol grubuna göre kat değişimleri ve p-değerleri

Grup3 (Tedaviye yanıtız Grup)		
Gen Adı	Fold-Change(Kat-Değişimi)	p-Value(p-değeri)
Snord61	1,00	Housekeeping gen
miR-150	0,08	0,003212
miR-10a	2,85	0,375747
miR-148b	0,35	0,038016
miR-130b	0,77	0,105655

Tablo 24 : Tedaviye yanıtız grubun yanıtlı gruba göre kat değişimleri ve p-değerleri

Grup3 (Tedaviye yanıtız Grup)		
Gen Adı	Fold-Change(Kat-Değişimi)	p-Value(p-değeri)
Snord61	1,00	Housekeeping gen
miR-150	0,05	0,000001
miR-10a	0,29	0,006950
miR-148b	0,18	0,003557
miR-130b	0,75	0,439569

miR-10a gen ifadesi, yeni tanı ve tedaviye yanıtlı hasta gruplarında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında up-regüle (kat değişimi >1) bulundu. miR-10a kat değişimi, yeni tanı hasta grubunda 11,17 kat artmış ve istatistiksel olarak anlamlı

bulundu ($p=0,003934$) (**Tablo 21**). miR-10a gen ifadesi, tedaviye yanıtı hasta grubunda kontrol grubuna göre 9.82 kat artmış (kat değişimi >1) ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000292$) (**Tablo 22**). Tedaviye yanıtı hasta grubunda ise miR-10a gen ifadesi, kontrol grubuna göre 2,85 kat yüksek (kat değişimi >1) bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,375747$) (**Tablo 23**). miR-10a gen ifadesi tedaviye yanıtı hasta grubunda, tedaviye yanıtı hasta grubuyla karşılaştırıldığında düşük (kat değişimi <1) bulundu. miR-10a yanıtı hasta grubunda yanıtı hasta grubuna göre 0,29 kat azalmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p= 0,006950$) (**Tablo 24**).

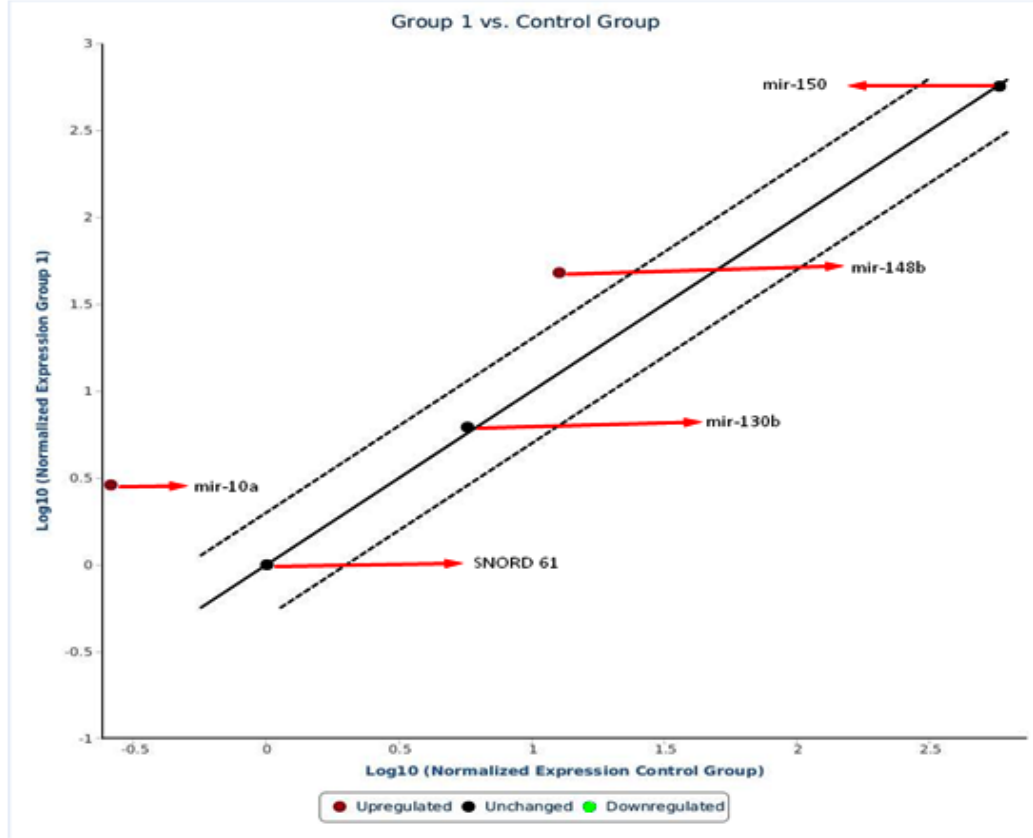
miR-150 gen ifadesi, yeni tanı hasta grubunda hem kat değişimi hem de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (kat değişimi=0.98, $p=0,863306$). miR-150 gen ifadesi, tedaviye yanıtı hasta grubunda 1,58 kat up-regüle (kat değişimi >1) bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,237789$) (**Tablo 21, 22**). miR-150 gen ifadesi, tedaviye yanıtı hasta grubunda düşük (kat değişimi <1) bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (kat değişimi=0,08 ve $p=0,003212$) (**Tablo 23**). miR-150 gen ifadesi tedaviye yanıtı ve yanıtı hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, yanıtı hasta grubunda yanıtı hasta grubuna göre 0,05 kat düşük (kat değişimi <1) ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,000001$) (**Tablo 24**).

miR-148b gen ifadesi, yeni tanı ve tedaviye yanıtı hasta gruplarında yüksek (kat değişimi >1) bulundu fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (kat değişimi= 3,78 ($p=0,125377$) ve kat değişimi=1,97 ($p=0,451892$) (**Tablo 21, 22**).

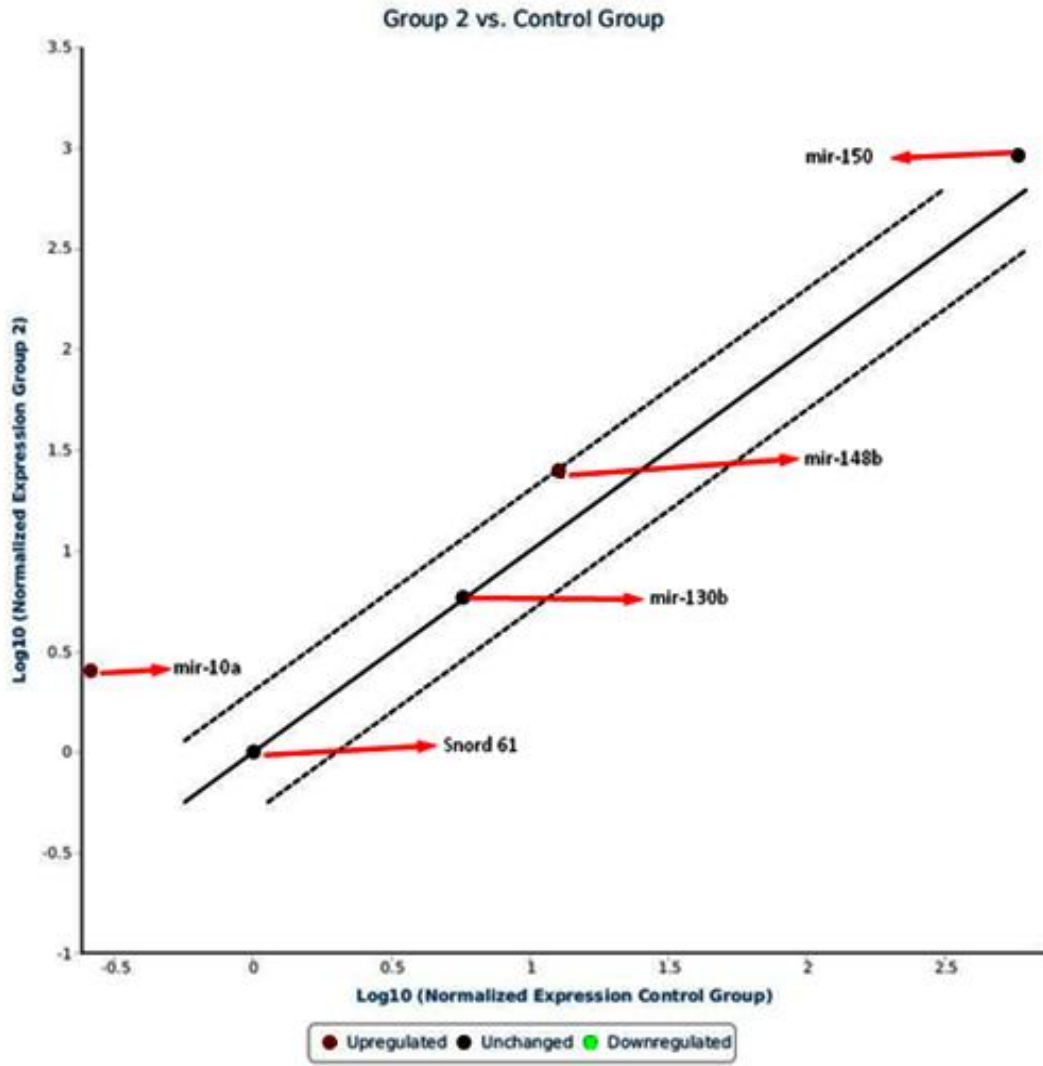
miR-148b gen ekspresyonu, yanıtı hasta grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında düşük (kat değişimi <1) bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (kat değişimi=0,35 ve $p=0,038016$) (**Tablo 23**). miR-148b gen ifadesi tedaviye yanıtı ve yanıtı hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, yanıtı hasta grubunda yanıtı hasta grubuna göre 0,18 kat düşük ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,003557$) (**Tablo 24**).

miR-130b gen ekspresyonu tüm gruplarda hem kat değişimi hem de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Grup1 kat değişimi=1,08, $P=0,617569$; Grup2 kat değişimi=1,03, $p= 0,271973$; Grup3 kat değişimi= 0,77, $p=0,105655$)(**Tablo 21-24**).

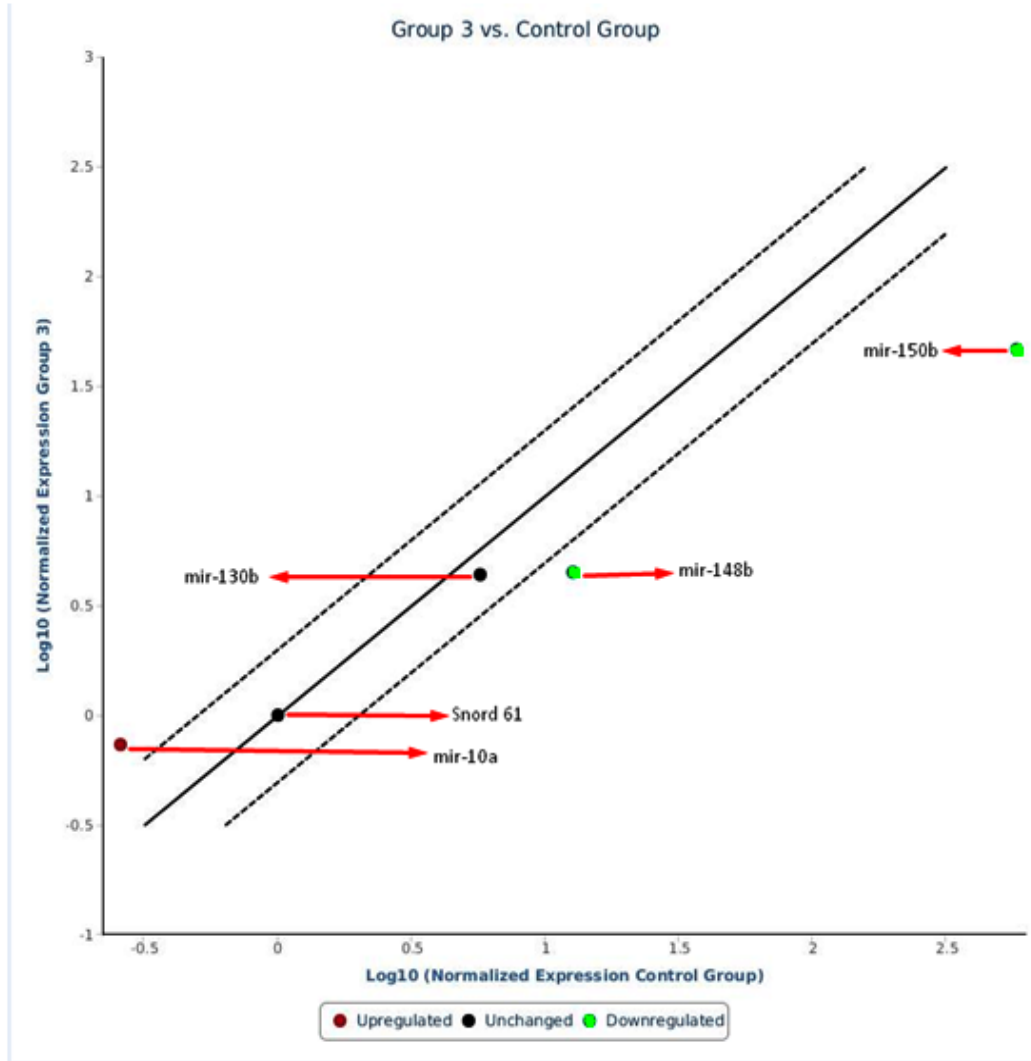
Çalışma gruplarımızın kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları aşağıdaki grafiklerde (Scatter Plot - Saçılım Grafiği) gösterilmiştir;



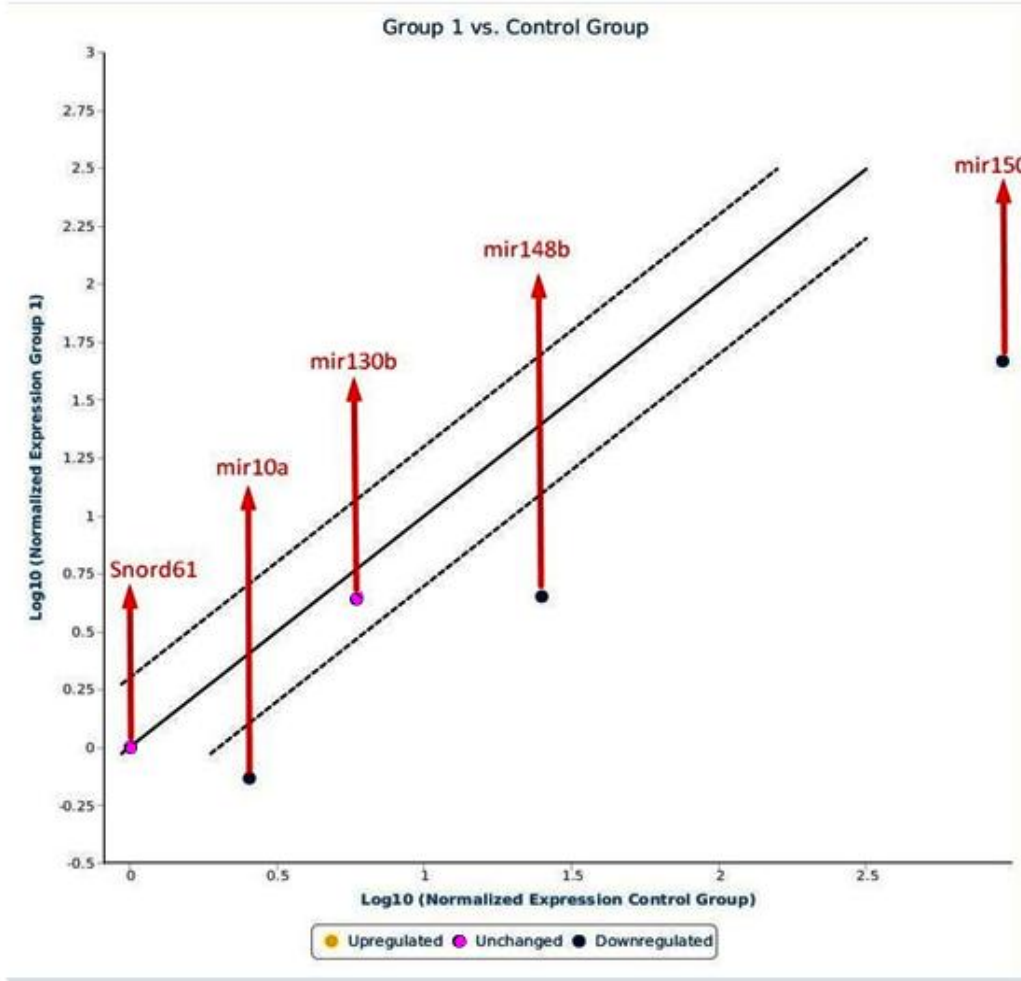
Şekil 18: Yeni tanı grubunun (Grup1) kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları. Ortadaki düz siyah çizgi kontrol grubunun ekspresyonlarını göstermektedir. Referans gen (Snord 61) ve ekspresyonları kontrol grubuyla aynı olan genler düz siyah çizginin üzerinde çıkmaktadır. Kesikli çizgiler yüksek ve düşük ekspresyonlar için sınır bölgeleridir. Üst kesikli çizginin sınırı yüksek ekspresyonu, alt kesikli çizginin sınırı düşük ekspresyonu göstermektedir. Grafiğe göre yeni tanı grubunda (Grup1) miR-10a gen ifadesi kontrol grubuna göre yüksek (kat değişimi>1) bulundu ve sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır (0,0039349) (Tablo 21). miR-148b gen ifadesi kontrol grubuna göre yüksek bulundu ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,125377) (Tablo 21).



Şekil 19: Tedaviye yanıtı hasta grubunun (Grup2) kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları. Grafiğe göre tedaviye yanıtı hasta grubunda (Grup2) miR-10a ve miR-148b ifadelenmeleri kontrol grubuna göre yüksek (Üst kesikli çizginin dışında) bulundu (**Tablo 22**). miR-10a gen ifadesi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,000292$). Ancak miR-148b gen ifadesi istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,451892$) (**Tablo 22**).



Şekil 20: Tedaviye yanıtız hasta grubunun (Grup3) kontrol grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları. Grafiğe göre tedaviye yanıtız hasta grubunda (Grup3) miR-10a gen ifadesi kontrol grubuna göre yüksek (üst kesikli çizginin dışında) bulundu ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,375747$) (Tablo 23). miR-150 ve miR-148b ifadelenmeleri kontrol grubuna göre düşük (alt kesikli çizginin dışında) bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,003212$, $p=0,038016$) (Tablo 23).



Şekil 21 : Tedaviye yanıtı olmayan hasta grubunun tedaviye yanıtı olan hasta grubuna göre normalize edilmiş ekspresyonları. Grafikte; grup1 diye belirtilmiş olan tedaviye yanıtı olmayan hasta grubudur, kontrol grubu diye belirtilen ise tedaviye yanıtı olan hasta grubudur. Yanıtı olmayan hasta grubunda, miR-10a, miR-150 ve miR-148b gen ifadeleri, tedaviye yanıtı olan hasta grubuna göre düşük (alt kesikli çizginin dışında) bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,006950$, $p=0,000001$, $p=0,003557$). miR-130b gen ifadesi hem kat değişimi hem de istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (ortadaki düz siyah çizgiye yakın) ($p=0,439569$) (**Tablo 24**). (Şekil 21’de ortadaki siyah düz çizgi tedaviye yanıtı olan hasta grubunun ekspresyonlarını göstermektedir. Snord61 referans genidir. Düşük ekspresyonlar alttaki kesikli çizginin dışına taşmaktadır. İki kesikli çizgi arasındaki gen ifadeleri karşılaştırmaya göre yüksek yada düşük çıkmayanları göstermektedir.

TARTIŞMA

Kanser ve genetik ilişkisine ait çalışmalarda keşfedilen mikroRNA'lar (miRNA) son derece güncel moleküllerdir. İnsanlardaki keşfi 2000'li yıllara dayanan miRNA'lar 1993 yılında tanımlanmıştır (13). Küçük endojen bir RNA kümesi olan ve messengerRNA (mRNA) üzerinden etkisini gösteren miRNA'lar 19-25 nükleotid büyüklüğündedir. miRNA'lar insan genomundaki RNA'ların %1-4'ünü oluşturmaktadır. Hedef mRNA'ların fonksiyonlarını etkileyerek etkisini gösteren miRNA'ların sayısı 2000'nin üzerine çıkmıştır. miRNA'lar hedef mRNA'ları tanıdıktan sonra; mRNA'ların parçalanması ya da translasyonun baskılanması şeklinde işlev görmektedir (15).

miRNA'lar, kromozomların kanserle ilişkili olduğu bilinen kırılgen bölgelerinde yer almaktadır. Bu ilişki ilk olarak Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında tespit edilmiş ve miR-15 ve miR-16-1 ifadelerinin bu hastaların çoğunda çok düşük ya da hiç ekspres edilmediği gösterilmiştir (20).

KML hastalarında ise, teşhis ve tedavi yanıtında biyobelirteç olarak miR-150'nin, teşhis için biyobelirteç olarak miR-203'ün, KML ve AML'yi ayırt etmek için miR-17/92 kümesinin, teşhis ve ilaç yanıtı için miR-10a'nın, ilaç direncinin biyobelirteç olarak miR-29a/b'nin rolünün olduğu ileri sürülmüştür (24). Başka bir çalışmada ise KML hastaları için iyi prognoz ve kötü prognoz olan miRNA'lar gösterilmiştir (25).

miRNA'ların tümör baskılayıcı ve onkogen olmak üzere iki şekilde işlev gördükleri düşünülmektedir. Tümör baskılayıcı olarak işlev görürken; onkogen ya da hücre farklılaşmasını veya apoptozisi kontrol eden genleri düzenleyerek kanserleri engelleyebilecekleri düşünülmüştür. Onkogen olarak işlev görürken apoptozisi kontrol eden genleri veya tümör baskılayıcı genleri negatif etkileyerek kanser gelişmesinde rol oynarlar (21).

Keşfedildiklerinden bu yana miRNA'ların işlev ve biyosentez mekanizmaları hakkında oldukça fazla bilgi elde edilmiştir. Düzenlenmelerindeki bozukluklar birçok kanser tipiyle ilişkilendirilmiş, ekspresyon profillerinin tanı ve tedavide faydalı kriterler sağlayacağı düşünülmüştür. Ayrıca kanserlerde düzenlenmeleri

bozulmuş birçok miRNA'nın apoptotik süreçlerde rol oynadığının belirlenmesiyle tümör oluşumunda miRNA'ların etkili olduğu belirlenmiştir.

Normal dokularda ve tümör dokularında farklı seviyelerde eksprese edilen miRNA'ların tespit edilmesi, aynı miRNA'ların insan kanserlerinde görevlerinin belirlenmesi çeşitli kanserlerdeki rollerinin aydınlatılabilmesi için faydalı olabilir. miRNA ifade düzeyi, kanser patogenezindeki rollerini araştırmak için hareket noktası olabilir. Bir miRNA'nın kanserli hücredeki az sentezlenmesi, fazla sentezlenmesi veya yokluğu kanserin başlangıcı ve gelişimindeki rolünü çalışmaya olanak vermektedir. miRNA'lar kanserin moleküler patolojisi ile ilgili sorulara yanıt olmaya aday gözükmektedirler. miRNA'ların çeşitli kanserlerde tanı ve tedavide kullanılabilmesi için hedeflerinin doğru tanımlanması ve verilerin belirli standartlara getirilmesi gerekmektedir. Her miRNA molekülü çok sayıda farklı mRNA'ya bağlanabilmektedir. Benzer şekilde her mRNA molekülü de çok sayıda miRNA'ya bağlanabilmektedir. Bundan dolayı miRNA'ların ifade etkinliklerin ve hedeflerinin belirlenmesine yönelik yeni bulgulara ihtiyaç vardır.

Daha önceden yapılmış olan çalışmaların ışığında biz de bu çalışmamızda, KML'li hastalarda Bcr-Abl miktarları ile miRNA düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştırdık. Bunun için yeni tanı almış, tedavilerine yanıt alınmış ve tedavilerine yanıt alınamamış yani direnç gelişmiş hastalarda hem Bcr-Abl miktarlarını hem de miRNA düzeylerini tespit ettik. Bu üç farklı hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA düzeylerinin belirlenmesi ile "Acaba miRNA'lar, tanı anında biyomarker olarak kullanılabilir mi? İlaç direncinin erken dönemlerde tespit edilerek en uygun tedavi şeklinin belirlenmesine katkı sağlayabilir mi?" diye düşündük. Kotagama ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada, KML teşhisinde ve tedavi yanıtında bir biyobelirteç olarak miR-150'nin, teşhis için biyobelirteç olarak miR-203'ün, KML ve AML'yi ayırt etmek için miR-17/92 kümesinin, teşhis ve ilaç yanıtı için miR-10a'nın, ilaç direncinin biyobelirteci olarak miR-29a/b'nin rolünün olduğu ileri sürülmüştür (24). Yeh ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yayınlanan makalede genel olarak KML hastaları için kötü prognoz ve iyi prognoz olan miRNA'lar gösterilmiştir. Aynı çalışmada; kronik miyeloid lösemide düzenlenmesi en sık bozulan miRNA'ların, miR-10a, miR-17/92, miR-150, miR-203 ve miR-328 olduğu, miR-17/92'nin tümör içeriğine bağlı olarak hem bir tümör baskılayıcı hem

de bir onkogen olabildiği, miR-17/92'nin tümör baskılayıcı fonksiyonun daha çok proliferatif proteinler BCL2, STAT5 ve JAK2 hedef alınarak açıklanabildiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, CDK inhibitörü CDKN1A' nın (p21) hedeflenmesi miR-17 / 92'nin onkojenik rolünü açıklayabildiği, miR-17/92'nin erken kronik fazda, blastik faza göre artmış ekspresyona sahip olduğu belirtilmiştir (25).

Böylece daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, miRNA'lar KML hastalarının teşhisinde kullanılabilir mi? KML hastalarının tedaviye yanıt alma süreçlerinde miRNA'ların katkısı var mı? KML hastalarının tedavi süreçlerinde gelişen ilaç direncinde miRNA'ların etkisi var mı? gibi sorulara yanıt aramaya karar verdik.

Yukarıdaki sorularımıza yanıt bulabilmek için, sağlıklı bireylerde, yeni tanı almış KML hastalarında, tedaviye yanıt alınmış KML hastalarında ve ilaç direnci gelişmiş KML hastalarında en yaygın olarak görülme ihtimali olan kötü prognoza sahip; miR-130b, miR-148b ve iyi prognoza sahip olan; miR-10a, miR-150 gen ekspresyonlarını araştırdık.

İncelenen miRNA' lardan miR-10a gen ifadesi, yeni tanı ve yanıtlı hasta gruplarında, kontrol grubuna göre yüksek düzeylerde (kat değişimi>1) bulundu. miR-10a gen ifadesi kontrol grubuna göre, yeni tanı grubunda 11,17 kat (p=0,003934) (**Tablo 21**), yanıtlı hasta grubunda 9,82 kat (p=0,000292) (**Tablo 22**) yüksek düzeyde (kat değişimi>1) bulundu. Yeni tanı grubunda miR-10a gen ifadesinin bu kadar artması miR-10a' nın tanı anında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini (örnek sayısı arttırılmış başka çalışmalarla desteklendikten sonra) gösterdiğini düşünmekteyiz. Tedaviye yanıtlı hasta grubunda miR-10a gen ifadesinin yeni tanı grubuna yakın çıkması miR-10a'nın daha önceki çalışmalarda da gösterildiği gibi aynı zamanda iyi prognoz olduğunu (örnek sayısı arttırılmış başka çalışmalarla desteklendikten sonra) göstermiştir (25). Diğer yandan mir-10a gen ifadesi tedaviye yanıtız ve yanıtlı hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, yanıtız hasta grubunda, yanıtlı hasta grubuna göre 0,29 kat azalmış (kat değişimi<1) bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,006950) (**Tablo 24**).

Bu sonuçların, tedavilerine devam edilen KML hastalarında belirli peryotlarla mir-10a düzeylerine bakılarak ilaç yanıtının öngörülmesi anlamında fikir verebileceğini düşünmekteyiz.

Aynı şekilde yine KML hastalarında iyi prognoz göstergesi olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan miR-150 gen ifadesi yeni tanı grubunda kat-değişimi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (kat değişimi=0.98, p=0,863306) (25). Tedaviye yanıtı hasta grubunda miR-150 gen ifadesi kontrol grubuna göre artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı (p=0,237789) (Bu sonucun hasta sayısı artırılmış başka çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz). miR-150 gen ifadesi tedaviye yanıtı hasta grubunda kontrol grubuna göre azalmış olarak bulundu (kat değişimi<1) ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,003212) (**Tablo 23**). miR-150 gen ifadesi tedaviye yanıtı ve yanıtı hasta gruplarında karşılaştırıldığında yanıtı hasta grubunda, yanıtı hasta grubuna göre 0,05 kat azalmış olarak bulundu (p=0,000001) (**Tablo 24**). miR-150 gen ifadesinin yanıtı grupta, hem kontrol grubuna hem de yanıtı gruba göre düşük düzeyde çıkması, ilaç direnciyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Örnek sayısı artırılmış başka çalışmalarla desteklendikten sonra daha net fikirler ileri sürülebilir.

Çalıştığımız miRNA'lerden miR-148b hem yeni tanı hem de tedaviye yanıtı grupta yüksek (kat değişimi>1) bulundu fakat sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (kat değişimi= 3,78, p=0,125377); kat değişimi=1,97, p=0,451892). Örnek sayısı artırılmış yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Tedaviye yanıtı grupta miR-148b düzeyi kontrol grubuna düşük düzeylerde (kat değişimi<1) bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,038016) (**Tablo 23**). miR-148b gen ifadesi yanıtı ve yanıtı hasta gruplarında karşılaştırıldığında yanıtı hasta grubunda, yanıtı hasta grubuna göre 0,18 kat azalmış olarak bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,003557) (**Tablo 24**). miR-148b gen ifadesinin yanıtı grupta, hem kontrol grubuna hem de yanıtı gruba göre düşük düzeyde çıkması, ilaç direnciyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Örnek sayısı artırılmış başka çalışmalarla desteklendikten sonra daha net fikirler ileri sürülebilir.

Çalıştığımız diğer miRNA olan miR-130b tüm hasta gruplarında kat değişimi ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (yeni tanı grubu kat değişimi=1,08, P= 0,617569; yanıtı hasta grubu kat değişimi=1,03, p= 0,271973; yanıtı hasta grubu kat değişimi=0,77, p=0,105655) (**Tablo 21-24**).

SONUÇ

Sonuç olarak;

1. KML hastalarında miR-10a'nın örnek sayısı arttırılmış başka çalışmalarla desteklendikten sonra teşhis için biyobelirteç olarak kullanılabilceğini düşünmekteyiz. Çünkü miR-10a ifade düzeyi, yeni tanı hasta grubunda kontrol grubuna göre 11,17 kat daha yüksek bulundu ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,003934$).
2. Tedaviye yanıtız KML hastalarında miR-150 ve miR-148b ifade düzeylerinin azalması tedaviye yanıt alınamamasında anlamlıdır. Çünkü tedaviye yanıtız hasta grubumuzda hem miR-150 (kat değışimi=0,08 ve $p=0,003212$) hem de miR-148b (kat değışimi=0,35 ve $p=0,038016$) gen ifadeleri hem kontrol grubuna hem de tedaviye yanıtılı hasta grubuna göre düşük düzeylerde bulundu. Başka çalışmalarla desteklendikten sonra miR-150 ve miR-148b gen ifadelerinin arttırılabilmesi çalışmalarının, ilaç direnci gelişmiş hastalarda tedavi seçeneklerine eklenebileceğini düşünmekteyiz.
3. Tedaviye yanıtılı hasta grubunda miR-10a gen ifadesi, yeni tanılı hastalara yakın düzeyde olduğu için, aynı zamanda tedaviye yanıtız hasta grubuyla karşılaştırıldığında tedaviye yanıtız grupta düşük düzeyde (0,29 kat azalmış) ($p=0,006950$) bulunduğu için başka çalışmalarla desteklendikten sonra, tedavi süresince belirli peryotlarda miR-10a gen ifadesine bakılmasının, tedaviye yanıt alma anlamında fikir verebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):14-22.
2. Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 2000;110(1):2-11.
3. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960 Jul;25:85-109.
4. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451-64.
5. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994 Feb;137(2 Suppl):S68-97.
6. Medical Research Council's Working Party for Therapeutic Trials in Leukaemia. Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan therapy. *Br Med J*. 1968;(1):201-208.
7. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:994-1004.
8. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2006; 355: 2408–2417.
9. Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, et al. International Randomized Study of Interferon Vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: Sustained Survival and Low Risk for Progression or Events in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CML-CP) Treated with Imatinib. *ASH Annual Meeting Abstracts 2009*; 114: 1126.
10. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6041–6051.
11. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007; 8: 1018–1029.
12. Litzow MR. Imatinib Resistance Obstacles and Opportunities. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:669-679.
13. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. 2003 Mar 7;299(5612):1540.
14. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259–269.
15. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004;15: 185–97.
16. Jack B. Cowland, Christoffer Hother and Kirsten Granbek. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 115: 1090–1106, 2007

17. Hanlon K, Rudin CE, Harries LW. Investigating the targets of MIR-15a and MIR-16-1 in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *PLoS One*. 2009;4:7169.
18. Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*.2007;315:1576-1579.
19. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, et al. (2008) An Analysis of Human MicroRNA and Disease Associations. *PLoS ONE* 3(10): e3420. doi: 10.1371/ journal. pone.0003420
20. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*.2002;99:15524-15529.
21. Wiemer AC: The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* 2007;43: 1529–1544.
22. Zhang B, Pan X, Cobb GP et al: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2006; 289: 3–16.
23. Hwang HW, Mendell JT: MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006;1-5.
24. Kotagama K, Yung C, and Marco M. "miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia." *Drug development research* 2015;76(6): 278-285.
25. Yeh Chien-Hung, Ramona Moles, and Christophe Nicot. "Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia." *Molecular cancer* 15.1 2016:37.
26. Geary CG. The story of chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 2000; 110(1):2-11
27. Wang AH, Wang YY, Yao Y, Xu ZZ, Zhou L, Wang L, Zhang L, Chen Y, Shen ZX, Hu J, Li JM. Summary of 615 patients of chronic myeloid leukemia in Shanghai from 2001 to 2006. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2010; 29: 20.
28. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999; 341(3):164-172
29. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukemia seen at a referral center over a 16-year period. *Br J Haematol*. 1997; 96(1):111.
30. Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 1998; 61(7): 1441-6.
31. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T, et al. Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies. *Pathol Res Pract*. 1990 Feb;186(1):3-27.
32. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: An international study. *Leukemia* 2013;27:1874–1881.
33. Haznedaroğlu, İ.C. (2007). Kronik myeloid lösemi, *Türkiye Klinikleri J Int MedSci*, 3(2):56-61.
34. İlhan O. (2012). Kronik Myelositer Lösemi. www.osmanilhan.com/ (Erişim Tar. : 10.10.2017)
35. Laneuville P. Abl tyrosine protein kinase, *Semin Immunol*, 1995, 7:255-66.

36. Deininger, M, Vierra, S, 2000. Bcr-Abl tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of CML, *Cancer Research*, 60; 2049- 2055.
37. Cilloni D, Saglio G, 2012, Molecular pathways:BCR/ABL, *Clin Cancer Res*, 18(4):930-937.
38. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96(10):3343-3356, 2000.
39. Drummond MW, Holyoake TL. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: so far so good? *Blood Rev.*15(2):85-95, 2001.
40. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 61:2343-2355, 2001.
41. Hanfstein B, Müller MC, Kreil S, Ernst T, Schenk T, Lorentz C, Schwindel U, Leitner A, Hehlmann R, Hochhaus A, 2011, *Haematologica*, Dynamics of mutant BCR/ABL positive clones after cessation of tyrosine kinase inhibitor therapy, 96(3): 360-36.
42. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* (2002) 16, 1402–1411
43. Srivastava S, Dutt S. Imatinib mesylate resistance and mutations: An Indian experience. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. Jul-Sep 2013; Vol 34, Issue 3
44. Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 21(56):8547-8559, 2002
45. Dikstein R, Heffetz D, Ben-Neriah Y, Shaul Y. c-abl has a sequence-specific enhancer binding activity. *Cell* 1992;5:751–7.
46. Pendergast AM, Gishizky ML, Havlik MH, Witte ON. SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Mol Cell Biol* 1993;13:1728–36.
47. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL1 in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005;5:172–83.
48. Hu Y, Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D et al. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet* 2004;36:453–61.
49. Bhatia R, Holtz M, Niu N, Gray R, Snyder DS, Sawyers CL et al. Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 2003;101:4701–07.
50. Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992;359:552-4.
51. Cardama AQ, Cortes J. Symposium on oncology practice: hematological malignancies chronic myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc* 2006;81:973-88.
52. Undi RB, Kandi R, Gutti RK. MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators. *Adv in Haematol* 2013; 2013: 1-20.
53. Saydam F, Değirmenci İ, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi* 2011; 38: 113-120.

54. miRBase. Browse miRBase by species (internette). Erişim: 11.12.2017, <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>.
55. MacFarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics* 2010; 11: 537-561.
56. Erdal, Mehmet Emin and Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ. "mikroRNA Çalışmaları ve Psikiyatriye Yansıması." *Türkiye Klinikleri Journal of Psychiatry Special Topics* 9.1 (2016): 16-24.
57. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006; 22: 165-173.
58. Cullen BR. Transcription and processing of Human microRNA Precursors. *Molecular Cell* 2004; 16: 861-865.
59. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013; 14: 475-488.
60. Meyers BC, Simon SA, Zhai J. MicroRNA processing: Battle of the Bulge. *Cur Bio.* 2010; 20: 68-70.
61. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, 2009.
62. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 2004.
63. Wu L, Fa J, Belasco GJ. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *PNAS*, 2006.
64. Vasudevan S, Tong Y, Steitz AJ. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs can Up-Regulate Translation. *Science*, 2007.
65. Alqadah A, Hsieh YW, Chuang CF. microRNA function in left-right neuronal asymmetry: perspectives from *C. elegans*. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 1-6.
66. Lawrie CH. MicroRNAs and lymphomagenesis: a functional review. *Brit J Haematol* 2013; 160: 571-581.
67. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7080–85.
68. Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down modulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18081–86.
69. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008;451:1125–29.
70. Chen C, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83–86.
71. Ramkinsoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 2005; 30: 643–47.
72. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol* 2005; 6:71.
73. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2009;50:160–70.
74. Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. Regulation of the germinal center

- response by microRNA-155. *Science* 2007;316:604–08.
75. Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol* 2007;35: 1657–67.
 76. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5078– 83.
 77. Ben Ami O, Pencovich N, Lotem J, Levanon D, Groner Y. A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:238–43.
 78. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7024–29.
 79. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 2005;207:243–49.
 80. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3627–32.
 81. O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med* 2008;205:585–94.
 82. Çelik Aşçı D, Koşar Aslan P, Özçelik N. MikroRNA’lar ve kanser ile ilişkisi. *S.D.Ü Tıp Fak. Derg* 2013; 20:121-127.
 83. Michael MZ, O’Connor SM, Van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882–891.
 84. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. *Molecular Oncology* 2010; 4: 230-241.
 85. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High Expression of Precursor MicroRNA-155/BIC RNA in Children with Burkitt Lymphoma. *Gene Chromosome Canc* 2004; 39: 167-169.
 86. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-6033.
 87. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S ve ark. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *PNAS* 2005; 102: 19075-19080.
 88. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer P D* 2010; 13: 208-217.
 89. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S ve ark. A Polycistronic MicroRNA Cluster, miR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-9632.
 90. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T ve ark. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 2006; 25: 2537-2545.
 91. Lamy P, Andersen CL, Dyrskjot L, Topping N, Orntoft T, Wiuf C. Are microRNAs located in genomic regions associated with cancer? *Brit J Cancer* 2006; 95: 1415-1418.

92. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12.
93. Chunjuan Dong, Min Ji and Chunyan Ji. MicroRNAs and their potential target genes in leukemia pathogenesis *Cancer Biology & Therapy*, 2009.
94. S. Mi, J. Lu, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 2007.
95. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 2007.
96. Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia, *Blood* 2008.
97. Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008.
98. Tanner SM, Austin JL, Leone G, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001.
99. Sonoki T, Iwanaga E, Mitsuya H, Asou N. Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2005.
100. Zanette DL, Rivadavia F, Molfetta GA, et al. miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia. *Braz J Med Biol Res*, 2007.
101. Chaubey A, Karanti S, Rai D, Oh T, Adhvaryu SG, Aguiar RC. MicroRNAs and deletion of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2009.
102. Pekarsky Y, Koval A, Hallas C, et al. TCL1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000.
103. Marcia Bellon, Yves Lepelletier, Olivier Hermine and Christophe Nicot. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia *Blood*, 2009.
104. Reinhold MUNKER and George A. CALIN. MicroRNA profiling in cancer. *Clinical Science*, 2011.
105. Chen Y, Song Y, Wang Z, Yue Z, Xu H, Xing C, Liu Z: Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointest Surg* 2010, 14:1170–1179.
106. Chen Y, Song Y, Wang Z. The MicroRNA-148/152 Family: Multi-faceted Players. *Molecular Cancer*; 2013; 12:43.
107. Merkerova M, Vasikova A, Belickova M, Bruchova H: MicroRNA expression profiles in umbilical cord blood cell lineages. *Stem Cells Dev* 2010, 19:17–26.
108. Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force AS, Fedorov Y: Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 2009, 4:e5605.
109. Wu Y, Liu GL, Liu SH, Wang CX, Xu YL, Ying Y, Mao P: MicroRNA-148b enhances the radiosensitivity of non-Hodgkin's Lymphoma cells by promoting radiation-induced apoptosis. *J Radiat Res* 2012, 53:516–525.

110. Huang JJ, Yu J, Li JY, Liu YT, Zhong RQ: Circulating microRNA expression is associated with genetic subtype and survival of multiple myeloma. *Med Oncol* 2012, 29:2402–2408.
111. Li R, Qian N, Tao K, You N, Wang X, Dou K: MicroRNAs involved in neoplastic transformation of liver cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, 29:169.
112. Zhao Y, Jia HL, Zhou HJ, Dong QZ, Fu LY, Yan ZW, Sun J, Ren N, Ye QH, Qin LX: Identification of metastasis-related microRNAs o hepatocellular carcinoma in hepatocellular carcinoma cell lines by quantitative real time PCR. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2009, 17:526–530.
113. Burmistrova OA, Goltsov AY, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova VA, Rogaev EI. MicroRNA in schizophrenia: genetic and expression analysis of miR-130b (22q11). *Biochemistry Biokhimiia*. 2007;72(5):578–82.
114. Lai KW, Koh KX, Loh M, Tada K, Subramaniam MM, Lim XY, et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(8):1456–63.
115. Li BL, Lu C, Lu W, Yang TT, Qu J, Hong X, et al. miR-130b is an EMT-related microRNA that targets DICER1 for aggression in endometrial cancer. *Med Oncol*. 2013;30(1):484.
116. Ma S, Tang KH, Chan YP, Lee TK, Kwan PS, Castilho A, et al. miR-130b Promotes CD133(+) liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):694–707.
117. Yang C, Cai J, Wang Q, Tang H, Cao J, Wu L, et al. Epigenetic silencing of miR-130b in ovarian cancer promotes the development of multidrug resistance by targeting colony-stimulating factor 1. *Gynecol Oncol*. 2012;124(2):325–34.
118. Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(7):2035–41
119. Y. Luo, G. Shan, W. Guo, et al., Fragile X mental retardation protein regulates proliferation and differentiation of adult neural stem/progenitor cells, *PLoS Genet*. 6 (2010) e1000898.
120. S. Bagga, J. Bracht, S. Hunter, et al., Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation, *Cell* 122 (2005) 553–563.
121. R.S. Pillai, S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, et al., Inhibition of translational initiation by Let-7 microRNA in human cells, *Science* 309 (2005) 1573–1576.
122. H.M. Heneghan, N. Miller, M.J. Kerin, Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome, *Obes. Rev.* 11 (2010) 354–361.
123. M. Akerblom, R. Sachdeva, I. Barde, et al., MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant, *J. Neurosci.* 32 (2012) 8879–8889.
124. R. Schickel, B. Boyerinas, S.M. Park, M.E. Peter, MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death, *Oncogene* 27 (2008) 5959–5974.

125. Stark A, Kheradpour P, Parts L, Brennecke J, Hodges E, Hannon GJ, et al. Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res* 2007; 17:1865-79.
126. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3:85.
127. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 2003; 5:1
128. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:11755-60.
129. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111:3183-9.
130. Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One* 2008; 3:2141.
131. Haznedar R. İliçin G, Biberöglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editorler). İç Hastalıkları. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003.1892-94.
132. Deviren A. Genel genetik. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları; 2002.
133. Marilyn L, Daniel P. Clinical cytogenetics and molecular cytogenetics. *J Zhejiang Univ Science B* 2006;7:162-3.
134. Branch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL (eds). The AGT cytogenetics laboratory manual. 3rd edition. USA: Lippincott-Raven; 1997.
135. Kearney L, Horsley SW. Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma* 2005;114:286-94.
136. Basaran N. Tıbbi genetik ders kitabı. Ankara: Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi; 1999.
137. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from periphera blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-16.
138. Yakut T, Gülten T. Cocukluk dönemi lösemilerindeki genetik değişiklikler ve klinik önemi. *Uludağ Univ. Tıp Fak. Derg.* 2005;31:57-62.
139. Basaran N. Teorik ve pratik Fluoresan In Situ Hibridizasyon (FISH). Eskişehir: Kurs kitapçığı; 1996.
140. Koo SH, Kwon GC, Chun HJ, Park JW. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analyses of hematologic malignancies in Korea. *Cancer Genet and Cytogenet* 1998;101:1-6.
141. Bayani J, Squire JA. Fluorescence in situ hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol* 2004;23:22.4.1-22.4.51.
142. McNeil N, Ried T. Novel molecular cytogenetic techniques for identifying complex chromosomal rearrangements: technology and applications in molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2000;2:1-14.
143. Kaeda J, Chase A, Goldman JM. Cytogenetik and molecular monitoring of residual disease in chronic myeloid leukemia. *Acta Hematologica* 2002; 107:64-75.

144. Ma SK, Wan TSK, Chan LC. Cytogenetics and molecular genetics of childhood leukemia. *Hematological Oncology* 1999;17:91-105.
145. Temizkan G, Arda N. Molekuler Biyolojide Kullanılan yöntemler. 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.
146. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
147. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
148. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
149. Kubista M, A Stalberg A, Bar T. Light-up probe based real-time QPCR. In: Raghavachari R, Tan W (eds). *Genomics and proteomics technologies*. 1st edition. Proceedings of SPIE; Bellingham, WA: International society of optical engineering; 2001.53-8.
150. Kantarjian H, Schiffer C, Jones D, Cortes J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCRABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* 2008;111:1774-80.



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÖZGEÇMİŞ

Adı	Murat	Soyadı	Yurt
Doğum Yeri	Ergani/Diyarbakır	Doğum Tarihi	08.11.1972
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	Tel	0 531 797 62 02
E-posta	myurt@dicle.edu.tr		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tezli Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya ABD	2009
Tezsiz Yüksek Lisans		
Lisans	Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Bölümü	1994
Lise	Diyarbakır/Ergani Lisesi	1990

İŞ DENEYİMİ

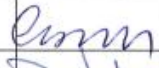


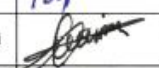
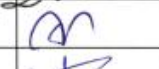



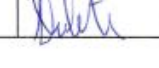


Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Öğretmen	Milli Eğitim Bakanlığı	1994-1998
Kimyager	Dicle Üniversitesi Hastaneleri	1998-Halen

Yabancı Dil Sınav Notu								
ÜDS/YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
66. 250								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	63. 199	67. 554	63. 935
(Diğer) Puanı			

EKLER

1.12. ETİK KURUL ONAYI

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR NONINTERVENTIONAL STUDIES					
KARAR					
<p>Doç. Dr. Hilmi ISI, Prof. Dr. Orhan AYYILDIZ, MSc. Murat YURT isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Kronik miyeloid lösemili hastalardan tedaviye yanıtı ve yanıtı olmayanların Bcr-Abl Miktarı İle miRNA düzeylerinin karşılaştırılması" başlıklı araştırmaya <i>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u</i> tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.</p> <p>Klinik araştırma tamamlanıp yayım aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.</p>					
DECISION					
<p>The project titled as "Comparing the amount of Bcr-Abl And miRNA levels in patients with chronic myeloid leukemia those who responded to the treatment and were nonresponsive" planned by Hilmi ISI, Orhan AYYILDIZ, Murat YURT has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.</p>					
Oturum No (Meeting number) :		Tarih (Date): 12.01.2017		Saat (Hour): 10:00-11:00	
KURUL BAŞKANI (CHIEF)		Prof. Dr. Hüseyin BÜYÜKBAYRAM			
KURUL ÜYELERİ / MEMBERS					
	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANSI	İMZA
1	Prof. Dr.	Hüseyin BÜYÜKBAYRAM	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Patoloji	
2	Prof. Dr.	Levent ERDİNÇ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyokimya	
3	Prof. Dr.	Zeki AKKUŞ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyoistatistik	
4	Doç. Dr.	Aziz KARABULUT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Kardiyoloji	
5	Doç. Dr.	İlker KELLE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
6	Doç. Dr.	Haktan KARAMAN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	
7	Doç. Dr.	Zülfükar YILMAZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	İç Hastalıkları	
8	Doç. Dr.	Cemil GÖYA	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Radyoloji	
9	Doç. Dr.	Ezeli AZARKAN	Dicle Üniversitesi Hukuk Fakültesi	Öğretim Görevlisi	
10	Yrd. Doç. Dr.	M. Veysi BAHADIR	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
11	Yrd. Doç. Dr.	Diclehan ORAL	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyoloji	

ORIJINALLIK RAPORU

Kronik Miyeloid Lösemili Hastalardan Tedaviye Yanıtlı ve Yanıtsız Olanların Bcr-Abl ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

ORIJINALLIK RAPORU

%**6**

BENZERLIK ENDEKSI

%**4**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**1**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

TÜM KAYNAKLARI EŞLEŞTİR (SADECE SEÇİLİ OLAN KAYNAĞI YAZDIR)

%2

★ www.thd.org.tr

İnternet Kaynağı

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Murat Yurt
Ödev başlığı: KRONİK MİYELOİD LÖSEMİLİ HAST...
Gönderi Başlığı: Kronik Miyeloid Lösemili Hastalarda..
Dosya adı: Tez-Murat_Yurt_31102018.docx
Dosya boyutu: 4.11M
Sayfa sayısı: 69
Kelime sayısı: 13,862
Karakter sayısı: 92,811
Gönderim Tarihi: 31-Eki-2018 01:56PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1030294698

Kronik Miyeloid Lösemili Hastalardan Tedaviye Yanıtı ve Yanıtız Olanların Bcr-Abl ve miRNA Ekspresyon Düzeylerinin Karşılaştırılması

Öğrencinin Adı ve Soyadı : Murat Yurt
Danışman : Doç.Dr. Hilmi İsa
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji

1. ÖZET

Amaç: Kanser ve genetik ilişkisine aili çarşınalarda keşfedilen mikroRNA'ların hastalıkla ilişkileri sadece malignitelerle sınırlı olmayıp, kalp hastalıklarından santral sinir sisteminde kadar birçok hastalık grubunda rol oynadıkları bilinmektedir. Çalışmamızda, KML'li hastaların Bcr-Abl ve miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi inceledik. Yeni tanı almış, tedavilerine yanıt almamış ve tedavilerine yanıt almamış hastalarda hem Bcr-Abl miktarlarını hem de miRNA düzeylerini tespit etmeyi amaçladık. Bu üç farklı hasta grubunda ve sağlıklı kontrol grubunda miRNA düzeylerinin belirlemesi ile miRNA'ların hem tanı amaçlı biyomarker olarak kullanılabilmesi, hem de ilaç direncinin erken dönemlerde tespit edilerek en uygun tedavi seçimine belirlenmesine katkı sağlayabileceği düşüncesiyle bu çalışmayı planladık.

Gereç ve Yöntem: Bu tez çalışmamıza yeni tanı almış ve KML tanısıyla izlenmekte olan 75 hasta ve kontrol grubu olmak üzere 25 sağlıklı bireyi dahil ettik. Çalışma için hastalardan ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinin RNA izolasyonunu yaptıktan sonra Real Time PCR cihazında hem Bcr-Abl hem de miR-10a, miR-150, miR-148b, miR-130b gen ekspresyonlarını belirledik.

Bulgular: İyi prognoz öldüğüleri sınırlanmış miR-10a gen ifadesi, yeni tanı ve yanıtı almamış grupta daha yüksek bulundu. İyi prognoz öldüğüleri sınırlanmış miR-150 ve kötü prognoz öldüğüleri sınırlanmış miR-148b gen ifadeleri yanıtız hasta grubunda düşük bulundu.

Sonuç: KML hastalarında miR-10a'nın teşhis ve tedavi takiplerinde biyomarker olarak kullanılabilirliği, miR-150 ve miR-148b gen ifadelerini analizlemenin tedavisi yeni alınmamış hasta grubunda anlamlı olduğunu düşünebiliriz.

Anahtar Kelimeler: KML, Bcr-Abl, miR-10a, miR-150, miR-148b