

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA UZUN
KODLAMAYAN RNA HOTAİR'İN
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

**Hazırlayan
Esmâ BENTLİ**

**Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA UZUN
KODLAMAYAN RNA HOTAİR'İN
PROGNOSTİK ÖNEMİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Esmâ BENTLİ**

**Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2016-6245 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığım ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Esmâ BENTLİ

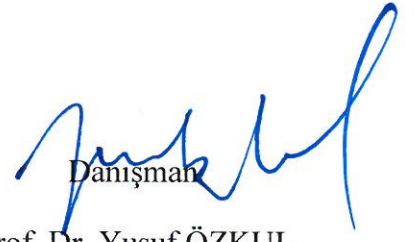
İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Hematolojik Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA HOTAIR’ın Prognostik Önemi” adlı **Yüksek Lisans Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Esmâ BENTLİ



Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

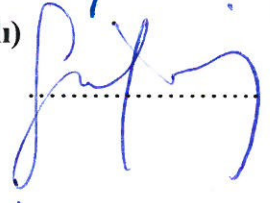
KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL danışmanlığında Esmâ BENTLİ tarafından hazırlanan “Hematolojik Hastalıklarda Uzun Kodlamayan RNA HOTAIR’ın Prognostik Önemi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

...../...../.....

JÜRİ

İmza

| | |
|---|---|
| <p>Danışman : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı)</p> |  |
| <p>Üye : Dr. Öğr. Üyesi Seçil YILMAZ (Erciyes Üniversitesi Halil Bayraktar Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü)</p> |  |
| <p>Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysun ADAN (Abdullah Gül Üniversitesi Yaşam ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü)</p> |  |

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalıőmalarımnda yardımcı olan Sayın Dr. Yagut AKBAROVA'ya, tez çalıőmalarım süresince yardım ve önerilerini esirgemeyen Tıbbi Genetik Laboratuvarı Uzm. Biyolog Hilal AKALIN ve Uzm. Kimyager Nazife TAŐCIOĐLU'na en içten teőekkürlerimi sunarım.

Tezimin sonuçlanmasında katkı ve desteklerinden dolayı Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a en içten teőekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalıőmalarım sırasında maddi manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve süreçte bana gösterdikleri sabırdan dolayı AİLEME sonsuz teőekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Esmâ BENTLİ

Kayseri, Ağustos 2018

HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA UZUN KODLAMAYAN RNA HOTAIR'IN PROGNOSTİK ÖNEMİ

Esmâ BENTLİ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2018

Danışman: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KISA ÖZET

HOTAIR epigenetik düzenleme, apoptoz ve hücre döngüsü dahil çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynayan uzun kodlamayan ribo nükleik asittir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *HOTAIR*'ın kanser olmayan komşu dokularla karşılaştırıldığında insanda görülen çeşitli kanserlerde yüksek oranda eksprese edildiği rapor edilmiştir. Literatürde hematolojik hastalıklarda *HOTAIR*'ın ifade profili ve prognostik önemi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, *HOTAIR* ve *HOXD* genlerinin AML ve KML gibi lösemilerle olan ilişkisi ve bu genlerin prognostik önemini araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarına gelen 30 AML ve 30 KML hastası ve kontrol grubu olarak da 20 sağlıklı bireyin periferik kan örnekleri kullanılarak total RNA izole edildi ve *cDNA* elde edildi. Real Time PCR yöntemi ile *HOTAIR* ve *HOXD* genlerinden *HOXD8*, *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade seviyeleri belirlendi.

AML hasta grubunda *HOTAIR* geninin ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$). KML hasta grubunda; *HOTAIR* geninin ifade düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0.05$). AML ve KML hasta gruplarında *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0.05$).

Sonuç olarak; *HOTAIR* geninin, KML hastalarında *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifadesini baskılayarak onkojenik faaliyet gösterdiği, *HOTAIR*'ın ifade profillerinin KML hastalarının prognostik olarak sınıflandırılmasında ve ilaç direncinin öngörülmesi ve izlenmesinde potansiyel bir biyomarkır olabileceği, daha fazla hasta sayısı içeren protein düzeyindeki çalışmalarla da desteklenerek söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: *HOTAIR*, lnc RNA, AML, KML, Prognoz

PROGNOSTIC IMPORTANCE OF LONG NON-CODING RNA HOTAIR IN HEMATOLOGICAL DISEASES

Esmâ BENTLİ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cell Sciences

Master of Science Thesis, August 2018

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

ABSTRACT

HOTAIR is a long non-coding ribonucleic acid that plays a role in various biological processes including epigenetic regulation, apoptosis and cell cycle. In recent years studies have reported that *HOTAIR* is highly expressed in various human cancers when compared to non-cancer adjacent tissues. There is not enough information about *HOTAIR*'s expression profile and prognostic value in hematologic diseases in the literature.

In this study, we aimed to investigate the relationship of *HOTAIR* and *HOXD* genes with leukemia such as AML and CML and the prognostic significance of these genes.

In our study, total RNA was isolated from peripheral blood samples of 30 patients with AML and 30 patients with CML who came to the Medical Genetics Laboratory of Erciyes University Medical Faculty and 20 healthy individuals as a control group and cDNA was obtained. Expression levels of the *HOXD8*, *HOXD9* and *HOXD11* genes from the *HOTAIR* and *HOXD* genes were determined by the Real Time PCR method.

When the expression level of the *HOTAIR* gene in the AML patient group was compared with the control group, there was no statistically significant difference ($p > 0.05$). In the CML patient group; there was a statistically significant increase in the expression level of the *HOTAIR* gene compared to the control group ($p < 0.05$). The expression levels of *HOXD9* and *HOXD11* genes in AML and CML patient groups were found to be statistically significantly lower than control group ($p < 0.05$).

As a result; It can be said that the *HOTAIR* gene is supported by also protein level studies that include oncogenic activity by suppressing the expression of *HOXD9* and *HOXD11* genes in CML patients, the classification of *HOTAIR* expression profiles as prognostic for CML patients, and the possibility of a potential biomarker in anticipating and monitoring drug resistance.

Keywords: *HOTAIR*, lncRNA, AML, CML, Prognosis

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa no</u> |
|---------------------------------------|-----------------|
| İÇ KAPAK | i |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK | ii |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI | iii |
| KABUL VE ONAY | iv |
| TEŞEKKÜR | v |
| KISA ÖZET | vi |
| ABSTRACT | vii |
| İÇİNDEKİLER | viii |
| KISALTMALAR | xi |
| TABLolar LİSTESİ | xiii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xv |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. KODLAMAYAN RNA'LAR..... | 3 |
| 2.1.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar..... | 5 |
| 2.2. HOTAIR..... | 7 |
| 2.2.1 Kanserde HOTAIR..... | 9 |
| 2.3. HOX GENLERİ..... | 10 |
| 2.3.1. HOXD8 Geni..... | 12 |
| 2.3.2. HOXD9 Geni..... | 12 |
| 2.3.3. HOXD11 Geni..... | 14 |
| 2.4. HEMATOLOJİK HASTALIKLAR..... | 14 |
| 2.4.1. Akut Myeloid Lösemi..... | 16 |
| 2.4.2. Kronik Myeloid Lösemi..... | 20 |
| 2.5. REAL TIME PCR..... | 22 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI | 27 |
| 3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar | 27 |
| 3.1.2. RNA İzolasyonu ve İfade Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler | 27 |
| 3.2. YÖNTEMLER | 28 |
| 3.2.1. Lökosit İzolasyonu..... | 28 |
| 3.2.2. Lökositten Total RNA İzolasyonu | 28 |
| 3.2.3. cDNA Sentezi..... | 29 |
| 3.2.4. PreAmp cDNA Sentezi..... | 31 |
| 3.2.5. Real Time PCR ile Hedef Genlerin İfade Düzeylerinin Kantitatif Olarak Saptanması | 32 |
| 3.3. İSTATİSTİK..... | 34 |
| 4. BULGULAR..... | 35 |
| 4.1. Optimizasyon | 35 |
| 4.2. Kontrol Grubunda Yaş ve Cinsiyet Dağılımı ile İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonları | 35 |
| 4.3. AML Hasta Grubunda Yaş, Cinsiyet ve Mutasyonların Dağılımı ile İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonları..... | 36 |
| 4.4. KML Hasta Grubunda Yaş, Cinsiyet ve Mutasyonların Dağılımı ile İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonları..... | 39 |
| 4.5. Kontrol ve Hasta Gruplarında Yaş ve Cinsiyet Dağılımları..... | 40 |
| 4.6. Kontrol Grubunda HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 Genlerinin Real Time PCR Analizi..... | 43 |
| 4.7. AML Hasta Grubunda HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 Genlerinin Real Time PCR Analizi..... | 45 |
| 4.8. AML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeylerinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması..... | 48 |
| 4.9. KML Hasta Grubunda HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 Genlerinin Real Time PCR Analizi..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 4.10. KML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeylerinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması | 53 |
| 4.11. AML ve KML Hasta Grupları Arasında Hedef Genlerin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması | 56 |
| 4.12. Kontrol ve Hasta Grupları Arasında Genlerin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması | 57 |
| 4.13. Tüm Sonuçların Birlikte Değerlendirilmesi | 59 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 61 |
| 6. KAYNAKLAR | 67 |
| EKLER | |
| ÖZ GEÇMİŞ | |

KISALTMALAR

| | |
|---------------|--|
| µL | : Mikrolitre |
| ABL | : Abelson onkogeni |
| ALL | : Akut Lenfoblastik Lösemi |
| AML | : Akut Myeloid Lösemi |
| BCR | : Breakpoint cluster region geni |
| BP | : Blast fazı |
| cDNA | : Komplementer DNA |
| CN | : Sitogenetik olarak normal |
| Cp | : Crossing Points, (geçiş noktaları) |
| CP | : Kronik Faz |
| CR | : Tam remisyon |
| Ct | : Eşik döngü değeri (threshold cycle) |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| EMT | : Epitelyal-mezenkimal geçiş |
| FAB | : French, American, British |
| HCC | : Hepatoselüler karsinom hücreleri |
| HOTAIR | : Homeobox Transkript Antisense İntergenik RNA |
| IM | : İmatinib mesilat |
| JAK | : Janus kinazı |
| Kİ | : Kemik iliği |
| KLL | : Kronik Lenfositik Lösemi |
| KML | : Kronik Myeloid Lösemi |
| lncRNA | : long non-coding RNA (uzun kodlamayan RNA) |
| LSD1 | : Lizine spesifik demetilaz 1 |
| MAPK | : Mitojen-aktifleştirilmiş protein kinaz |
| MEG3 | : Maternally expressed gene 3 |
| miRNA | : mikroRNA |
| MM | : Multiple Myeloma |
| MPO | : Myeloperoksidaz |
| mRNA | : messenger RNA |
| MRP2 | : Multidrug resistance protein 2 |

| | |
|------------------|---|
| ncRNA | : non coding RNA (kodlamayan RNA) |
| ng | : Nanogram |
| Ph | : Philadelphia kromozomu |
| piRNA | : P-element induced wimpy testis proteini ile etkileşimi olan RNA |
| PRC1 | : Polycomb baskılayıcı kompleks-1 |
| PRC2 | : Polycomb baskılayıcı kompleks-2 |
| pri-miRNA | : Primer transkript mikro RNA |
| PTEN | : Fosfataz ve tensin |
| PCR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| qPCR | : Kantitatif polimeraz zincir reaksiyon |
| qRT-PCR | : Gerçek Zamanlı kantitatif reverse transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| Real Time | : Gerçek Zamanlı |
| RISC | : RNA-induced silencing complex (RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi) |
| RNA | : Ribo Nükleik Asit |
| RNAi | : RNA interferans |
| rRNA | : Ribozomal RNA |
| RT-PCR | : Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| S.E.Mean | : Standart Error Mean |
| SB | : Sudan Black |
| siRNA | : small interfering RNA |
| sn RNA | : small nükleer RNA |
| SNHG5 | : Small nucleolar RNA host gene 5 |
| SPSS | : Statistical Package for Social Science (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi) |
| STAT | : Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü |
| tRNA | : Taşıyıcı RNA |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) |
| WIF-1 | : Wnt sinyal yolağı inhibitor faktörü |
| XIST | : X inaktif spesifik transkript |

TABLOLAR LİSTESİ

| | <u>Sayfa no</u> |
|---|-----------------|
| Tablo 2.1. Akut Myeloid Lösemide FAB Sınıflandırılması | 19 |
| Tablo 3.1. cDNA Reaksiyonu için Hazırlanan 1. Karışım | 30 |
| Tablo 3.2. cDNA Reaksiyonu için Hazırlanan 2. Karışım | 30 |
| Tablo 3.3. cDNA Sentezi için Gerekli Sıcaklık Döngüsü | 31 |
| Tablo 3.4. Beta Actin, HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 genler için kullanılan primer dizilimleri | 31 |
| Tablo 3.5. PreAmp cDNA Sentezi için Hazırlanan Karışım | 32 |
| Tablo 3.6. PreAmp cDNA Sentezi için Gerekli Termal Döngü Koşulları | 32 |
| Tablo 3.7. Gen İfadesi Reaksiyon Karışımı | 33 |
| Tablo 3.8. Lightcycler 480 II Real Time PCR Cihazında Ayarlanan Sıcaklık ve Süreler | 34 |
| Tablo 4.1. Kontrol grubunda yaş, cinsiyet dağılımı ve ölçülen RNA konsantrasyonları | 36 |
| Tablo 4.2. AML hasta grubunun yaş, cinsiyet, mutasyonları ve ölçülen RNA konsantrasyonları | 37 |
| Tablo 4.3. AML hasta grubun klinikopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılması | 38 |
| Tablo 4.4. KML hasta grubunun yaş, cinsiyet dağılımı ve ölçülen RNA konsantrasyonları | 39 |
| Tablo 4.5. Kontrol ve hasta gruplarında yaş dağılımı | 40 |
| Tablo 4.6. Hasta gruplarında cinsiyetler arası yaş dağılımı | 41 |
| Tablo 4.7. Kontrol grubunda cinsiyetler arası yaş dağılımı | 42 |
| Tablo 4.8. Kontrol Grubunda Genlerin İfade Düzeyleri | 45 |
| Tablo 4.9. AML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeyleri | 47 |
| Tablo 4.10. Kontrol ve AML Hasta Gruplarında Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması | 49 |
| Tablo 4.11. KML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeyleri | 52 |

| | |
|---|----|
| Tablo 4.12. Kontrol ve KML Hasta Gruplarında Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması | 53 |
| Tablo 4.13. AML ve KML Hasta Gruplarında Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması..... | 57 |
| Tablo 4.14. Kontrol ve Hasta Gruplarında (AML-KML) Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması | 58 |
| Tablo 4.15. Kontrol Grubu, AML Grubu ve KML Hasta Grupları Arasında Hedef Genlerin İfade Seviyelerinin Birlikte Değerlendirilmesi..... | 59 |



ŞEKİLLER LİSTESİ

| | <u>Sayfa no</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.1. <i>HOTAIR</i> ' in genomik lokalizasyonu | 7 |
| Şekil 2.2. <i>HOTAIR</i> 'ın gen susturma mekanizması..... | 8 |
| Şekil 2.3. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik olarak gösterilmesi | 23 |
| Şekil 2.4. Floresan işaretli prob ile Real Time PCR işlemi | 24 |
| Şekil 2.5. Roche Lightcycler 480 II Real Time PCR cihazı | 26 |
| Şekil 4.1. AML hasta grubunda mutasyonların dağılım oranları | 38 |
| Şekil 4.2. AML (1), KML (2) ve Kontrol (3) gruplarında yaş dağılımlarının görünümü... | 40 |
| Şekil 4.3. Hasta gruplarında cinsiyetler arası yaş dağılım grafiği..... | 41 |
| Şekil 4.4. Kontrol grubunda cinsiyetler arası yaş dağılımının grafiği..... | 42 |
| Şekil 4.5. Kontrol grubunda <i>Beta-actin</i> genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri | 43 |
| Şekil 4.6. K2 no'lu kontrol örneğinin <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD8</i> , <i>HOXD9</i> , <i>HOXD11</i> genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri | 44 |
| Şekil 4.7. Kontrol grubunda <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD8</i> , <i>HOXD9</i> , <i>HOXD11</i> genlerinin ifade seviyelerinin ortalama değerleri grafiği | 45 |
| Şekil 4.8. AML hasta grubunda <i>Beta-actin</i> genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri | 46 |
| Şekil 4.9. H1 no'lu AML hasta örneğinin <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD8</i> , <i>HOXD9</i> , <i>HOXD11</i> genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri..... | 47 |
| Şekil 4.10. AML hasta grubunda <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD8</i> , <i>HOXD9</i> , <i>HOXD11</i> genlerinin ifade seviyeleri ortalama değerleri grafiği | 48 |
| Şekil 4.11. AML ve kontrol grubunda <i>HOXD9</i> ve <i>HOXD11</i> genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri..... | 49 |
| Şekil 4.12. AML ve kontrol grubunda <i>HOXD9</i> ve <i>HOXD11</i> genlerinin ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması | 50 |
| Şekil 4.13. KML hasta grubunda <i>Beta-actin</i> genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri..... | 51 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.14. H34 no'lu KML hasta örneğinin <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD8</i> , <i>HOXD9</i> , <i>HOXD11</i> genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri..... | 51 |
| Şekil 4.15. KML hasta grubunda <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD8</i> , <i>HOXD9</i> , <i>HOXD11</i> genlerinin ifade seviyeleri ortalama değerleri grafiği..... | 52 |
| Şekil 4.16. KML ve Kontrol grubunda <i>HOTAIR</i> genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri..... | 54 |
| Şekil 4.17. KML ve kontrol grubunda <i>HOXD9</i> ve <i>HOXD11</i> genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri..... | 54 |
| Şekil 4.18. KML ve kontrol grubunda <i>HOTAIR</i> gen ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması | 55 |
| Şekil 4.19. KML ve kontrol grubunda <i>HOXD9</i> ve <i>HOXD11</i> gen ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması..... | 55 |
| Şekil 4.20. KML ve kontrol grubunda <i>HOTAIR</i> , <i>HOXD9</i> ve <i>HOXD11</i> gen ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması..... | 56 |
| Şekil 4.21. AML ve KML hasta grupları arasında hedef genlerin ifade seviyelerinin ortalama değerleri | 57 |
| Şekil 4.22. Kontrol ve hasta grupları (AML-KML) arasında hedef genlerin ifade seviyelerinin ortalama değerleri | 58 |
| Şekil 4.23. Kontrol grubu, AML ve KML hasta gruplarında hedef genlerin ifade seviyelerinin ortalama değerleri | 60 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memeli genomunun yaklaşık %1.5'lük kısmı messenger RNA'ları (mRNA) ifade etmektedir. Protein kodlayan mRNA'ların dışında kalan %98.5'lük bir kısmı protein kodlamayan uzun ve kısa RNA'lardan oluşmaktadır (1,2). Genomun farklılığı ve karmaşık yapısı bu bölgelerden kaynaklanmaktadır (2). Nükleotid sayısı 200'den daha fazla olan RNA'lar uzun kodlamayan RNA'lar olarak tanımlanmaktadır (3). Homeobox Transkript Antisense İntergenik RNA (*HOTAIR*) uzun kodlamayan RNA'lar arasındadır. 2158 nükleotid içeren 12.kromozomda lokalize olmuş lncRNA'dır (4). Yapılan son çalışmalarda; kanser olmayan komşu dokularla karşılaştırıldığında, insanda görülen çeşitli kanserlerde *HOTAIR*'ın daha fazla eksprese edildiği rapor edilmiştir. Yapılan kapsamlı analizlerde ise; *HOTAIR*'ların kanser metastazında, tümör boyutlarında, yaşam süresinin kılmasında ve ileri derece patolojik aşamalarda bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (5). *HOTAIR*'ın ifadesinin baskılanmasıyla hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda tümör oluşumu ve çoğalması inhibe olmaktadır (6). Bu nedenle kanser araştırmalarında *HOTAIR* yeni bir çalışma alanı olmaya başlamaktadır. Literatürde, hematolojik hastalıklarda *HOTAIR*'ın ifadesi ve prognostik önemi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Akut ve kronik lösemiler başlıca hematolojik hastalıklardandır. Kan kanseri olarak da adlandırılan lösemi; kemik iliğinde blast adı verilen anormal hücrelerin birikmesiyle meydana gelen, bu hücrelerin periferik kana ve tüm dokulara yayılması sonucu oluşan malign bir hastalıktır. Genel olarak akut lösemiler erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Kronik lösemiler ise yetişkinlerde görülmektedir. Kronik Myeloid Lösemi (KML) 25-60 yaş aralığında gözlenir ve yetişkinlerde görülen lösemilerin %20-30'unu oluşturmaktadır. Akut Myeloid Lösemi (AML) her yıl tanı konan yeni lösemilerin yaklaşık %20'sini oluşturur. Kronik lösemilerde sağkalım süresi yıllarla ölçülebilirken

akut lösemiler, hastada genelde kötü seyirlidir ve tedavi edilmediği takdirde sağkalım süresi haftalar veya birkaç ayla sınırlı olan hastalıklardır (7).

Hastanın genetik profiline göre en uygun tedavi seçilmelidir. Bu amaca yönelik son zamanlarda uzun kodlamayan RNA'ların kanser tanısında biyomarkır olarak kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır (8).

Bu çalışmada, *HOTAIR* ve *HOXD* genlerinin AML ve KML gibi lösemilerle olan ilişkisi ve bu genlerin prognostik önemini araştırmak amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. KODLAMAYAN RNA'LAR

Ribo Nükleik Asit (RNA), bir nükleotid birimi, bir azotlu organik baz, bir şeker ve bir fosfat molekülünden oluşan bir polimerdir. Her nükleik asit bir diğeriyle birleşir ve tek yapılı bir zincir oluşur. Genetik bilgileri üzerinde taşıyan Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)'den farklı olarak RNA, tek zincirli bir yapıya sahiptir. Timin yerine urasil bazı ve riboz şekeri içermektedir. Bir RNA molekülünün sentezi DNA yönetimi altında gerçekleşmektedir. DNA replikasyonu sırasında kalıp zincir görevi gören tamamlayıcı zincir, bir RNA nükleotid dizisinin oluşması için de kalıp görevi görür. Böylece üretilen RNA her canlının kendine özgü genlerinin güvenilir bir kopyasını içermektedir. Bu tip bir RNA molekülü protein sentezi için gerekli olan genetik bilgiyi DNA'dan protein sentezi yeri olan ribozomlara taşıdığı için mRNA olarak adlandırılır (9). Genetik bilginin proteine translasyonu süreçlerinde mRNA dışında farklı tipte RNA'lar da bu sürece katılmaktadır. mRNA, DNA'daki bilgiyi protein sentez yeri olan ribozomlara taşır. Ribozomal RNA (rRNA), ribozomun en önemli kısımlarını oluşturur. Taşıyıcı RNA (tRNA) ise protein sentezinde kullanılmak üzere aminoasitlerin taşınmasında gereklidir (10). Ancak insan genomunun yaklaşık %1.5'u protein kodlayan gen dizilerinden oluşurken, protein kodlayan mRNA'ların dışında kalan %98.5'lik bir kısmı, protein kodlamayan uzun ve kısa RNA'lardan oluşmaktadır (1,2). Proteine translasyonu gerçekleşmeyen bu işlevsel RNA molekülleri, non coding (nc) RNA'lar olarak adlandırılır (11). Genomun farklılığı ve karmaşık yapısının çoğu bu bölgelerden kaynaklanmaktadır (2).

Önceleri sadece bilgiyi depolayan ve DNA ile protein arasında basit bir bilgi taşıyıcısı olarak görülen RNA'nın, organizmaların gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve kilit bir molekül olduğu artık bilinmektedir (12). Örneğin, yaşamsal kodlamayan RNA'lar olarak bilinen tRNA, rRNA ve small nükleer (sn) RNA'lar protein sentezi başta olmak

üzere hücresele birçok işlemlerin kritik bileşenleridir (13). Bu ncRNA'lar hücresele cevap, biyolojik olayların katalizlenmesi gibi pek çok göreve sahiptir. Transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası gen susturulmasında görev alırlar (14). Ayrıca kromozomların yeniden modellenmesi gibi görevleri de üstlenirler (15).

RNA interferans (RNAi), canlı hücreler içinde yer alan ve hangi genlerin proteine translasyon olacağını belirleyen ve kontrol eden transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. Bu mekanizma doğal bir işlem olup, canlı organizmadaki biyolojik fonksiyonu, hem virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlere karşı genomu korumak hem de ökaryotik organizmaların gelişimsel programlarının fonksiyonu için önemli olan transkripsiyon sonrası gen susturma ile gen regülasyonunda önemli rol oynamaktır (16). Mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda bulunan RNAi mekanizmasında mikroRNA (miRNA) ve small interfering RNA (siRNA) rol almaktadır (17). Bu ncRNA dizilerinin belirlenmesi ve fonksiyonlarının aydınlatılması; RNAi, post-transkripsiyonel düzenleme, gen susturulması gibi kavramların ortaya çıkmasını sağlamıştır (18).

Sayıları her geçen gün artan ncRNA'lar genellikle uzunluklarına göre sınıflandırılırlar (19). Kısa düzenleyici RNA'ların uzunlukları 15-40 baz çifti arasında değişmektedir. Bunlara örnek olarak siRNA, miRNA ve *P-element induced wimpy testis* (PIWI) proteini ile etkileşimi olan piRNA verilebilir (14).

miRNA, 20-23 nükleotid uzunluğunda olup sayısı insanlarda 1000'i geçmektedir (20). Primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından genomik DNA'dan sentezlenir. pri-miRNA 500-3000 baz uzunluğunda, "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. pri-miRNA'lar, RNaz tip III enzimi olan *Drosha-Pasha* (insan DGCR8) protein kompleksi tarafından kesilerek pre-miRNA oluştururlar (21). pre-miRNA nüklear transport reseptör ile nükleustan sitoplazmaya geçer. miRNA'lar sitoplazmada RNAaz tip III enzim ailesinden *Dicer* adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA dubleksine çevrilir. Bu dubleksin bir ipliği olgun miRNA olarak görev yaparken, diğeri nükleazlar tarafından parçalanır. *Dicer*, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNaz olan *argonaute'un* etkisiyle bu iki iplikten 5' ucu daha kararlı olanı seçilip komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik (*guide strand*) olarak adlandırılır. Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır, RISC kompleksinin

substratı olarak sindirilir. miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra, ya *argonaute* proteinleri yardımıyla miRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (22).

miRNA'lar mRNA moleküllerinin proteine çevrilmesini engelleyerek ya da onların yıkımına yol açarak gen ifadesini negatif olarak düzenlerler (23). Ayrıca, miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ifadesini düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği görülmektedir (24). Protein kodlayan genlerin en az üçte birinin miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. Dolayısıyla miRNA'lar, hücre gelişimi, farklılaşma, gen düzenlenmesi, kromatin düzenlenmesi ve apoptoz gibi farklı yolları düzenleyerek hücrede ve dolayısıyla kanser gelişiminde son derece kritik rol oynarlar (13).

Calin ve ark. 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) hastalarında yaptıkları moleküler çalışmada, miRNA'ların kanser gelişim süreci ile ilişkisini ilk defa ortaya koymuştur. miR-15 ve miR-16'da meydana gelen bozuklukların, 13q14 kromozom delesyonuna neden olarak KLL'ye yol açması ile miRNA'ların kanser gelişim süreci ile ilişkisi gösterilmiştir (25).

Özellikle insanlarda görülen karmaşık hastalıklarda, tüm değişkenlerin %95'i protein kodlayan düzenleyici RNA dizilerinde aranırken son yıllarda birçok ncRNA dizisinin belirlenmesi ve fonksiyonlarının açıklanmasıyla başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkta ncRNA'ların ifade düzeylerinin değiştiği gösterilmiştir (26). Bu ncRNA'ların kanserli dokudaki ifade düzeylerinin ölçülmesi yoluyla, özellikle hastalığın prognozu ile ilgili bilgi edinilmekte ve böylece ncRNA'lar biyomarkır olarak kullanılabilir (27). ncRNA'ların sadece kanser oluşumu ve gelişiminde yer almadığı; kardiyolojik, nörolojik, inflamatuvar hastalıklardan, işitme kaybı ve kromozom anomalilerine kadar geniş bir hastalık grubunda etkili oldukları belirlenmiştir (28).

2.1.1. Uzun Kodlamayan RNA'lar

Uzun kodlamayan RNA'lar (lncRNA) da nükleotid sayısı 200 den fazladır ve bu RNA'lar aynı zamanda makro RNA ve uzun intergenik kodlamayan RNA olarak da adlandırılır. lncRNA'lar genellikle genomda genler içinde, intron içinde, genler arası bölgede veya protein kodlayan genlerin karşı zincirlerinde yerleşik olabilmektedirler. Protein kodlayan genler ile birlikte, konumuna göre bir lncRNA, sense, antisense,

bidirectional (iki yönlü), intronik ve intergenik olarak beş kategoriden bir veya daha fazlasına sınıflandırılabilir (29).

lncRNA'ların yer aldığı gen bölgelerinin histon modifikasyonlarının RNA polimeraz II ilişkili olması, bu bölgelerde RNA polimeraz II varlığının gösterilmesi, moleküllerin 5' şapka ve poli-A kuyruğuna sahip olmaları, yazılımın RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirildiğini gösteren biyokimyasal kanıtlardır (30). İnsan genomunun ayrıntılı açıklanmasıyla elde edilen bulgular binlerce lncRNA'nın var olduğunu göstermektedir.

Bugüne kadar yapılan en kapsamlı araştırmalarla; toplamda tahminen 140.000 ncRNA'nın var olduğunu ve 58.648'inin (%79'u daha önce açıklanmamış) lncRNA olup bu moleküllerin geniş bir sınıfı oluşturduğu tahmin edilmektedir (31,32).

Maternal allelden eksprese edilen ve embriyogenezde ve insan karsinogenezinde rol alan H19 geni, 1990 yılında tanımlanan ilk lncRNA'dır (33). H19'un keşfinden kısa bir süre sonra, gen susturma X inaktif spesifik transkripti (XIST) keşfedilmiştir (34). Bununla birlikte, ilk miRNA olan lin-14'ün keşfi ve daha sonraki miRNA alanındaki atılımlar, ncRNA araştırmasına odaklanmasını lncRNA'lardan miRNA'lara çekmiştir. İlk defa *C.elegans*'ın gelişimini çalışan Lee ve ark. tarafından 1993 yılında tanımlanan lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiği rapor edilmiş ve miRNA terimi 2001 yılından itibaren kullanılmaya başlanmıştır (35,36). lncRNA ile ilgili araştırmalar, bütün transkriptom dizilendirme teknikleriyle gelişerek önemli derecede büyümüştür. lncRNA'nın birkaç yeni fonksiyonel açıklamasıyla birleştirilmiş yeni teknolojiler, lncRNA keşfini ve işlevsel araştırmalarını büyük ölçüde hızlandırmıştır (37).

lncRNA'ların işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, lncRNA'nın artan sayıları ve birçok biyolojik sürece katılımı için biriken kanıtlar, normal ve malign hücrede önemli fonksiyonlara sahip olduklarını göstermiştir (38). lncRNA dizisi, DNA ya da RNA özgül dizilerine bağlanarak veya proteinlere bağlanarak işlev görürler. Bu diziler gen ifadesinin yanı sıra protein sentezini de düzenler. Bazı lncRNA'lar, kromatin düzenlemesi ve yapısının yanında doğrudan yazılımı düzenleme işlevleri ile de deneysel olarak tanımlanmıştır (39).

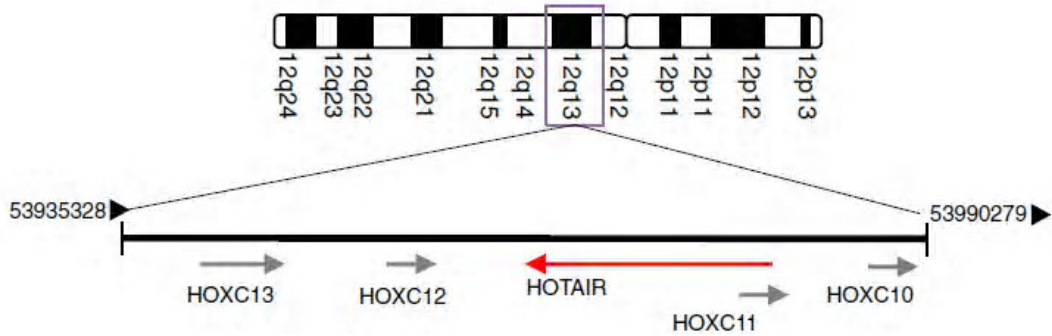
Son zamanlarda yapılan araştırmalar ile bu moleküllerin etki mekanizmaları yeni yeni ortaya çıkmakta ve olası mekanizmaları; RNA polimeraz II aktivitesini inhibe ederek genlerin transkripsiyonuna müdahale edebilmesi, kromatinin yeniden modellenmesi ve histon modifikasyonları indükleyerek gen ifadesinin azalmasına neden olabilmesi, bir

antisens lncRNA'nın tamamlayıcı transkripti hibridize ederek alternatif splice modellerini değiştirebilmesi, lncRNA ve mRNA'nın hibridizasyonu *Dicer*'in endojen siRNA'ları üretmesine izin vermesi, lncRNA'ların protein ortaklarına bağlanabilmesi, protein aktivitesini düzenleyebilmeleri, yapısal bileşenler olarak görev alabilmesi veya protein lokalizasyonunu değiştirebilmesi ve lncRNA'ların belirli süreçlerden geçerek küçük RNA öncüleri üretebilmesi olarak açıklanmıştır (8).

lncRNA'ların birçoğunun farklı kanser türlerinde ifade düzeylerinin değiştiği bildirilirken, kanser gelişimindeki rolleri tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle bu moleküllerin mekanizmalarının aydınlatılması güncel araştırma konularından birini oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, lncRNA'ların birçok hücrel yolakta görev aldığını ve kanserde düzenlenmelerinin bozulduğunu ortaya koymaktadır (40).

2.2. HOTAIR

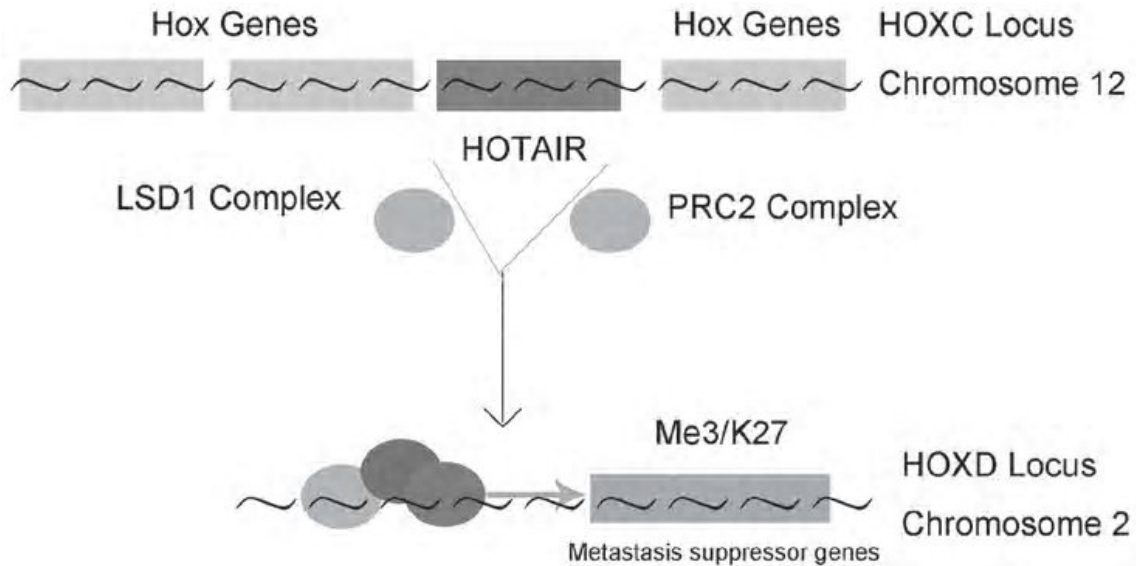
İnsanda *HOTAIR* (Homeobox Transkript Antisense İntergenik RNA) 12. kromozomun *HOXC* lokusunda *HOXC11* ve *HOXC12* arasındaki intergenik bölgede lokalize, çeşitli kanserlerde ifadesi artan 2158 nükleotidli 6 ekzondan oluşan lncRNA'dır (4). *HOTAIR* ilk olarak 2007 yılında Rinn ve ark. tarafından 2. kromozom üzerinde *HOXD* geninin ifadesini baskılayan bir lncRNA olarak keşfedilmiştir (8). *HOTAIR* 12q13 kromozomunda bulunan *HOXC* geninin antisense zincirinden transkribe olur. *HOTAIR*; *HOXC12* ve *HOXC11* tarafından çevrelenmiştir (Şekil 2.1.) (41).



Şekil 2.1. *HOTAIR*' in genomik lokalizasyonu (41)

İlk olarak *Drosophila melanogaster*'de tanımlanan *PcG* genleri, memelilerde son derece korunmuş, histon modifikasyonu yoluyla gen susturulmasını uyaran ve sonuçta kromatin yapısını etkileyen, polycomb baskılayıcı kompleks-1 (PRC1) ve polycomb baskılayıcı kompleks-2 (PRC2) olmak üzere iki büyük *PcG* protein sınıfını oluşturur (42). PRC1, histon 2A lizin 119 monoubikinitasyonu (H2AK119ub1) ile erken embriyogenez için çok önemlidir (43). PRC2 ise bir histon H3 lizin 27 (H3K27) metilazdır ve embriyonel gelişim ve kanser oluşumu sürecinde gen susturulmasında görev almaktadır (44).

HOTAIR da dahil olmak üzere lncRNA'lar ve polycomb proteinleri arasındaki ilişki epigenetik düzenlenmedeki gen susturulma olayında ortak bir mekanizma olarak kabul edilir. PRC2 tek başına genomik bölgeleri hedefleyemez ve susturamaz. Bunun yerine, PRC2'yi genomun spesifik bölgelerine yönlendirmek için *HOTAIR* bağlanması gereklidir. Böylece PRC2 gen ifadesini ilişkilendirir ve epigenetik olarak susturur. *HOTAIR* bağlanması, PRC2'nin genom çapında yeniden hedeflenmesine neden olur. *HOTAIR*, sırasıyla PRC2 ve lizine spesifik demetilaz 1 (LSD1) komplekslerine bağlanan 5' ve 3' alanlarından oluşan bağımsız iki alan içerir. *HOTAIR*-PRC2-LSD1 kompleksi daha sonra 2. kromozom üzerindeki *HOXD* lokusunu hedef alır ve metastazın bastırılmasında rol oynayan genleri susturur (Şekil 2.2.) (45).



Şekil 2.2. *HOTAIR*'ın gen susturma mekanizmasındaki rolü (45)

HOTAIR, doğrudan c-MYC ya da dolaylı olarak SETDB1/STAT3 sinyal yolağı tarafından indüklenebilmektedir (46). *HOTAIR*'ın, metastazı teşvik etmek için kromatini

yeniden programladığı açık olup tümör oluşumunda, metastazda ve ilaç direncinde moleküler mekanizmaları araştırılmaktadır (47).

2.2.1. Kanserde HOTAIR

Çoğu insan kanserinde, kanserli olmayan bitişik dokularla karşılaştırıldığında, yüksek düzeyde *HOTAIR* eksprese olduğu tespit edilmiştir (47). *HOTAIR* kanser hücrelerinde fazla eksprese edildiği zaman tümör baskılayıcı miRNA'ları (miR-34a, miR-141) antagonize etmektedir (6,48). Mide kanseri hücrelerinde *HOTAIR*'ın rekabetçi bir endojen RNA olarak görev yaptığı ve bu şekilde miR-331-3p inhibisyonu ile onkogen insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)'nin ifadesini arttırdığı ve epitelyal-mezenkimal geçişleri (EMT) kolaylaştırdığı gösterilmiştir (6).

Ma ve ark. safra kesesi kanseri dokularında c-MYC ve *HOTAIR*'ın mRNA seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenirken miR-130a'nın negatif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (48). Akciğer kanser hücrelerinde *HOTAIR*'ın, genleri ve sinyal yollarını düzenlediği; fazla ifadesinin metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (49). Zhuang ve ark. akciğer kanserinde *HOTAIR*'ın tip 1 kollajen tarafından indüklenerek tümör mikroçevresinde anormal şekilde eksprese edildiğini göstermişlerdir (50). Bhan ve ark. yaptığı bir çalışmada göğüs kanseri dokusuna göre göğüs kanseri hücrelerinde *HOTAIR*'ın daha az eksprese edildiğini belirtmişlerdir. Bu durumda hücre kültürlerinde metastaz teşvik sinyallerinin *HOTAIR* ifadesini etkileyebileceğini ifade etmişlerdir (51). *HOTAIR*'ın göğüs kanseri hücrelerinde estradiol, bisfenol-A ve dietilstilbestrol tarafından transkripsiyonel olarak indüklendiği rapor edilmiştir (52).

HOTAIR'ın insanlarda kolon, kolorektal, gastrik adenokarsinoma dokular, nazofarenks karsinomu, birincil hepatoselüler karsinom, böbrek karsinomu hücreleri gibi çeşitli kanser türlerinde fazla eksprese edildiği bildirilmiştir (4, 53-57).

Prostat kanseri, pankreatik karsinom, sarkom ve diğer tümör tipleri arasında *HOTAIR* ifadesi yönünden bir ilişki olduğu bildirilmiştir (58).

Li ve ark. yaptığı bir çalışmada *HOTAIR*'ın fosfataz ve tensin (PTEN) homolog metilasyonunu teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Bu nedenle insan larinks skuomöz kanser hücrelerinde onkojenik bir rol oynadığı rapor edilmiştir. PTEN'in metilasyonu sonucunda mRNA ve protein düzeylerinde PTEN'in ifadesi azalmaktadır. Bu olay sonucunda P13-AKT-mTOR sinyal yolları aktive olmakta ve p53 aracılı apoptozis baskılanmaktadır (59).

HOTAIR ile Wnt inhibitör faktör 1 (WIF-1) arasında ters korelasyon vardır. *HOTAIR*'ın WIF-1 ifadesini inhibe ettiği ve Wnt yolağını aktive ettiği bildirilmiş ve bu durum özofagus skuamöz karsinom hücreleri ve dokularında gösterilmiştir (60).

WIF-1, Wnt / beta-katenin sinyalizasyon yolunda önemli bir rol oynar. *HOTAIR*, promotör bölgesinde histon H3K27 metilasyonunu teşvik ederek WIF-1 ifadesini doğrudan baskılar ve daha sonra Wnt / beta-katenin sinyal yolağını aktive eder. Wnt / beta-katenin sinyal yolunun aktivasyonu, miR-200a seviyesini azaltarak EMT'yi desteklediği gösterilmiştir (61).

Temel olarak, *HOTAIR*'ın ifadesinin baskılanmasıyla hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda tümör oluşumu ve çoğalması inhibe olmaktadır (56,62).

Neticede *HOTAIR*'ın; insanda çeşitli kanserlerde proliferasyonu, metastazı, EMT'yi sağladığı ve ilaç direnci üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, kanserde düzensizliğe yol açan mekanizması aydınlatılmaya devam etmektedir (47).

2.3. HOX GENLERİ

HOX genleri, birçok gelişimsel süreçte işlev gören önemli transkripsiyon faktörlerini kodlayan düzenleyici genler olarak işlev görür. Tüm homeotik genler *HOX* denilen 180 nükleotidlik ortak bölge içermektedir. Bu bölgeler bugüne kadar belirlenen tüm *HOX* genlerinde bulunan temel DNA bağlanma alanını oluşturmaktadır (63). *HOX* genleri ilk olarak 1978 yılında *Drosophila*'da keşfedilmiştir. Son 30 yıl içinde hidradan insana kadar geniş bir dizi hayvan grubunda analiz edilen *HOX* genleri, anterior-posterior eksen gelişiminin önemli düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır. *HOX* genleri, her lokusta ardışık olarak düzenlenir, böylece 3 'ile 5' pozisyonlarının dağılımı paralel olur ve embriyoda 3 'faktör anterior olarak, 5' faktör posterior olarak ifade edilir (64).

Memelilerde *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* ve *HOXD* olmak üzere 4 gruba ayrılan 39 çeşit *HOX* geni farklı kromozomlarda lokalize olmaktadır. *HOXA* 7. kromozom (7p15.3), *HOXB* 17. kromozom (17p21.3), *HOXC* 12. kromozom (12q13.3) ve *HOXD* geni 2. kromozom (2q31) üzerinde yer alan homolog bir sekans organizasyonunda düzenlenmiş 9-11 arasında gen içermektedirler (65). *HOX* genleri, embriyonik gelişim sırasında anterior-posterior vücut eksenini modellemesinde önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörleri olmalarının yanı sıra son yıllarda, postnatal gelişme sırasında da fonksiyonel rolleri tespit edilmiştir (66). Ayrıca, embriyonik gelişim sonrası bazı organlarda da

eksprese olduğu ve dokuya özgü yapının devamının sağlanmasında rolleri olduğu ileri sürülmüştür (67).

HOX genlerinin çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde oynadığı rollerle ilgili önemli ölçüde bilgiler elde edilmiştir (64). *HOX* genleri birçok hücrenel süreçte kritik düzenleyici rol oynaması nedeni ile bu genlerin ifadesindeki değişimler mutasyonlarda çoğalma, büyüme ve farklılaşma gibi çoğu mekanizmayı etkileyerek kanser gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (68). Yapılan çalışmalarda akciğer karsinoması, nöroblastom, glioma, yumurtalık kanseri ve lösemi gibi tümörlerde *HOX* genlerinin ifadelerindeki değişimler bildirilmiştir (63). Cillo ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, insanda görülen böbrek, kolon ve akciğer kanserlerinde, bazı *HOX* genlerinin ifadelerinde normale göre değişimler olduğu (artma veya azalma) belirtilmiştir (67). Belirli *HOX* genlerinin değişen ifadelerinin, kanser gelişimi, invazyon ve metastaz gibi maligniteler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (69). Bazı spesifik *HOX* genlerinin ifadesindeki değişimlerin muhtemelen sadece tümör gelişiminde değil, aynı zamanda maligniteler ile ilişkili olabilecek onkogenез veya progresyona neden olan doku tipi ve tümör yerleşimine göre farklı eğilimler gösterdiği bildirilmiştir. (70).

HOX genlerinin ifadelerinde meydana gelen değişimler, AML ve ALL dahil birçok maligniteyle ilişkilendirilmiştir. *HOX* genlerinin artan ifadeleri, kötü prognoz ile seyreden FLT3 mutasyon vakaları ile azalan ifadeleri ise AML'nin kısmen iyi seyirli sitogenetik alt grubuyla ilişkilendirilerek AML'de önemli bir prognostik faktör haline gelmiştir (71).

Andreeff ve ark. tarafından yapılan çalışmada, primer AML örneklerinde *HOX* gen ifadesindeki belirgin değişimin yanı sıra AML'de *HOX* gen ifadesi varlığı veya yokluğu ile ilişkili mutasyonlar ve klinik sonuçlar tanımlanmıştır (72). Ancak *HOX* genlerinin ifade değişimi, düzenleyici mekanizmalarla açık bir şekilde anlaşılammıştır. *HOX* gen bölgelerindeki transkripsiyonel profillerin, sağlıklı hücreler ve AML ile uyumlu lösemik hücreler arasında benzer olduğu gösterilmiştir. AML ile uyumlu lösemik hücrelerin çoğunda, *HOX* ifadesinin, belirli düzenleyici elementler ile epigenetik mekanizmalar tarafından kontrol edilen normal bir kök hücre programı ile regüle edildiği öngörülmüştür (73).

2.3.1 HOXD8 Geni

HOXD8 geni 2. kromozomda (2q31.1) yer alan, 2 ekzondan oluşan *HOX* gen ailesine ait bir genidir. *HOXD* gen grubunun tamamında veya bu genin 5 'ucunda meydana gelen delesyonlar, ciddi ekstremit ve genital anormalliklerle ilişkilendirilmiştir. Embriyoda, RNA polimeraz II promotorundan transkripsiyonun negatif ve pozitif regülasyonu, iskelet gelişim süreçlerinde rol oynar. Embriyogenez sırasındaki düzenleyici etkilerine ek olarak, bu özel genin yetişkin ürogenital sistem fonksiyonunda rol oynayabileceği bildirilmiştir (74).

Kanai ve ark. kolorektal ve hepatosellüler karsinom dokularındaki *HOX* genlerinin ifade düzeylerinin, sağlıklı dokulardakinden farklı olduğunu göstermişlerdir. Karaciğer metastazı bulunan kolorektal karsinom dokularındaki *HOXD8* düzeyinin, sağlıklı karaciğer dokusuna göre daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Kolorektal kanserlerde primer dokular ve hepatik metastatik dokularda gen ekspresyonunun farklı olduğu tek *HOX* geninin *HOXD8* olduğu görülmüş ve *HOXD8*'in bir metastaz baskılayıcı olarak işlev gördüğü düşünülmüştür. Edinilen sonuçlar ile, *HOX* genlerinin ifadesindeki farklılıkların kolorektal ve hepatosellüler karsinomların karsinogenezi ve malign progresyonunda önemi belirtilmiştir (75).

Diğer *HOXD* genlerinden *HOXD9* ve *HOXD10*'un da *HOXD8* ile birlikte göğüs kanserlerinde normal göğüs dokularına kıyasla önemli ölçüde ifadesinin azaldığı belirtilmiştir (76). Fare embriyonik kök hücre kaynaklı endotel hücreleri ile yapılan bir çalışmada *HOXD8*'in lenfatik damarların olgunlaşması ve yapısının korunmasında önemli bir rol oynayan *Prox1* tarafından belirgin şekilde indüklendiği gösterilmiştir. Bu durum insan umbilikal ven endotel hücrelerinde ve dermal lenfatik endotel hücrelerinde gözlenmiştir. *Prox1* ve *HOXD8*'in transkripsiyonel ağlarının, lenfatik damarların olgunlaşması ve bakımında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (77).

2.3.2. HOXD9 Geni

HOXD9 geni, 2q31-2q37 kromozom bölgelerinde bulunan gelişimsel düzenleyici sistemin parçası olan *HOXD* genlerinden biridir (78). *HOXD9*, gelişme süreci boyunca embriyonik segmentasyon ve ekstremit gelişmesi için önemlidir. Bu gen ön ayak ve ekstenel iskeletin gelişimine ve modellemesine katılır (79).

Otuz dokuz *HOX* geninin tiroid kanseri hücre hattındaki ifade düzeylerinin normal tiroid dokularındaki ifade düzeyleri ile karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada;

HOXD9'un normal tiroid bezinde eksprese edildiği, ancak herhangi bir kanser hücre hattında eksprese olmadığı gösterilmiştir (80).

HOXD9'un, E-cadherin'in transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Naito ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kullanılan tüm tiroid kanseri hücre hatlarında E-cadherin ifadesinin olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca tiroid bezini de içeren klinik kanser numunelerinde E-cadherin'in kaybı veya azalmış ifadesi bildirilmiştir (81). Böylece, *HOXD9*'un E-cadherin'in ifadesini sürdürerek bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görebileceği düşünülmüştür (80,81). Meme kanseri hücrelerinin gelişimi, invazivitesi ve migrasyonunun *HOX* genlerinin ifadelerindeki değişimlerle ilişkili olup olmadığını araştırmak için yapılan bir çalışmada; *HOXD9* geninin de içinde yer aldığı on bir *HOX* (*HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXC11*, *HOXD3*, *HOXD4*, *HOXD8*, *HOXD9* ve *HOXD10*) geninin normal dokulara kıyasla meme kanseri hücrelerinde ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (82).

Ayrıca, hasta örneklerinden elde edilen insan glioma kanseri kök hücrelerinde, normal astrosit hücreleri; sinir kökü/progenitör hücreler ile karşılaştırıldığında *HOXD9* ifadesinde artış gözlemlendiği bildirilmiştir (79).

HOXD9 gen promotorunun DNA metilasyonu, transkript ve proteini etkilediği ve aynı zamanda melanom beyin metastazının erken evrelerinde daha yüksek *HOXD9* düzeyleri olduğu gösterilmiştir (80,83).

HOXD9, çeşitli kanser hücrelerinde onkojen olarak da işlev görür. Xiupeng ve ark. yaptığı çalışmada; *HOXD9*'un artan ifadesinin, hepatoselüler karsinom hücrelerinin (HCC) migrasyonu, invazyonu ve metastazını önemli ölçüde arttırabildiğini göstermişlerdir. *HOXD9*'un aynı zamanda HCC hücrelerinde EMT'yi desteklediği görülmüştür. *HOXD9* upregülasyonunun HCC gelişimiyle korelasyon gösterebildiği belirtilmiştir (84).

EMT, embriyonik gelişim sırasında epitel hücrelerinde spesifik, morfolojik ve fenotipik değişiklikler anlamına gelir ve tümör progresyonu ve kemoterapiye dirençle yakından ilişkilidir. Cao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, EMT'nin kolorektal kanser hücrelerinin invaziv kabiliyetini arttırdığı, böylece uzak mesafeli metastazı indüklediği gösterilmiştir (85).

2.3.3. HOXD11 Geni

HOXD11 geni, hücre gelişimi ve şekillenmesi, proliferasyon, migrasyon, apoptoz gibi pek çok hücrel süreçlerin gelişimini ve kontrolünü düzenleyen *HOX* gen ailesine ait genlerden biridir. 2. kromozomda lokalize (2q31.1) 338 amino asitten oluşan proteini kodlayan 2 ekzondan oluşan bir homeodomaindir (86). *HOXD11* geninin farelerde ön sırt morfolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir (87).

HOX genleri AML'de kromozomal yeniden düzenlemelerin regülasyonu ile dolaylı olarak da yer alabilir. AML'de görülen t(2;11) (q31;p15) kromozomal anormalliklerinin sadece *NUP98-HOXD13* değil aynı zamanda *NUP98-HOXD11* füzyon geninde de oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Lösemik hücre dizilerinde *HOXD11* ve *HOXD13* genlerinin ifadelerinin farklı olmasına rağmen *NUP98-HOXD* füzyon genleri benzer füzyon proteinlerini kodlamakta ve *NUP98-HOXD11*'in yanı sıra *NUP98-HOXD13* füzyon proteininin benzer bir mekanizma yoluyla lösemi gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir. *HOXD11* geninin ifadesi, BCR-ABL-pozitif hücrelerde BCR-ABL-negatif lösemik hücre dizilerinden anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. BCR-ABL-pozitif lösemi hücrelerinde *HOXD11* geninin fazla ifadesinin nedeni belirsizdir. *HOXD11* ve *HOXD13* de dahil olmak üzere bir veya daha fazla *HOX* geninin ifadesinin lösemilerin gelişimi veya çoğalması ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (86). Bununla birlikte, *HOXD11* geninin ifadesi, normal mesane ve mesane kanserinde karşılaştırılmış ve iki doku arasında ifade farkı olduğu belirtilmiştir (70). *HOXD11* ile birlikte *HOXA11* ve *HOXC11* genlerindeki ekspresyon kayıplarının metanefrik böbrek indüksiyonunun tamamen kaybına yol açmasına rağmen renal hücreli karsinomalarda bu genlerin ifadesinin fazla olduğu bulunmuştur (88).

2.4. HEMATOLOJİK HASTALIKLAR

Hematopoez, çok basamaklı ve çok faktörlü bir süreçtir. Bu süreç son derece detaylı ve dikkatli bir süreçle kontrol edilmektedir. Bu süreçlerin herhangi bir evresinde, erken dönem ya da olgunlaşmış hücrelerde ve onların kaderini belirleyen genlerde meydana gelen genetik değişimler hematolojik hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (89). Hematolojik hastalıklar; kanın şekilli elemanlarının azalması, çoğalması veya şekil değişikliği ile karakterize yapısal ya da fonksiyonel bir dizi bozukluğu içermektedir (90).

Her yaş ve cinsiyeti etkileyen bu hastalığın etiyojisi halen tam olarak bilinmemektedir. Bazı bilinen kalıtsal faktörlere ek olarak, çevresel ve kimyasal maruziyetler ile ortaya çıkan ve hastalığın ilerleyişini ya da tedavi cevabını etkileyen genetik faktörler tanımlanmıştır. Özellikle son 10 yılda teknolojiye yüksek ivmeli ilerleme hematoloji alanına da yansımış ve tanı, tedavi ve hatta sınıflandırmada kullanılabilecek yeni biyomarkırlar hızla belirlenmeye başlanmıştır (89).

Lösemi, blast adı verilen lösemi hücresinin kontrolsüz çoğalması sonucu başta kemik iliği olmak üzere çeşitli organ ve dokuları tutan malign bir hastalıktır. Tedavi edilmediği zaman ölümlerle sonuçlanır (7). Lösemiler; hastalığın gidişine göre akut ve kronik, kökenine göre lenfoid ve myeloid, tutulum yerine göre de kan, kemik iliği ve doku şeklinde sınıflandırılır (90).

Lösemilerde genel olarak tanı; kemik iliği aspirasyonu ve tam kan sayımı ile konulur. Tedavi ise; kemoterapi, ilik nakli veya kök hücre transplantasyonudur. Lösemi çeşitleri; Kronik Myeloid Lösemi (KML), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), Akut Myeloid Lösemi (AML), Multiple Myeloma (MM) olarak sınıflandırılabilir (91).

KML, erişkin hastalığıdır ve en çok 25-60 yaşları arasında görülür. Bütün kemik iliği elemanları olgunlaşmadan kontrolsüzce çoğalır. Kanseri türleri arasında en belirsiz başlayanıdır. Kronik evrede; hastaların çoğu, 3-4 yıl süren bu fazda tespit edilir. Hızlanmış evrede; hastalarda kan ve kemik iliğindeki blast sayısında artış gözlenmektedir. Bu evre genellikle kısa sürer. Bu fazda birçok hasta yaşamını yitirir. Blastik evrede; kan ve kemik iliğindeki blastik hücre sayısı %30'un üzerindedir. Hastaların çoğu AML'ye döner ve 3 ay içinde kaybedilir (89).

ALL, lenfoblastlara benzeyen olgunlaşmamış beyaz kan hücrelerinin sayısındaki artışla karakterize malign bir hastalıktır. Çocukluk dönemi lösemilerinin %80'ini oluşturur. Erişkinlerde de görülebilir. ALL'de hastanın kemik iliği çok sayıda blast üretir. Blastlar lenfositlere dönüşmez ve lökosit, eritrosit, trombosit üretilmez. Bu dönemdeki şikayetler nezle veya diğer sık gözlenen hastalık şikayetlerine benzer niteliktedir. Halsizlik, dispne, solgun görünüm, sık sık enfeksiyona yakalanma, diş çürükleri, kesiklerin güç iyileşmesi semptomlar arasındadır (90).

KLL, olgun görünüme sahip lenfositlerin kemik iliğinde aşırı üretimi ile kendini gösterir. Fakat bu anormal hücreler tam olarak olgunlaşmış normal lenfositler gibi görünseler de,

vücudu enfeksiyonlara karşı koruyamazlar. Lenf düğümlerinde büyüme, splenomegali, kan tablosunda bozulma ve enfeksiyonla karakterizedir (89).

AML, kemik iliğinde olgunlaşmamış hücrelerde bir sorun meydana geldiği zaman oluşur. Örneğin vücut yeterli sayıda sağlıklı kan hücresi üretememektedir. Belirti ve bulguları ise eritrosit, lökosit, trombosit eksikliği ile ilişkilidir (7).

MM, kemik iliğinin kanseridir. Nedeni, immün sistemde görevli olan plazma hücrelerinin çoğalmasındır. MM'da plazma hücreleri kontrolsüz şekilde çoğalarak, aşırı ve tek tip immünglobülin üretirler. Kanser hücreleri kemiklerde ve kemik iliklerinde toplanarak, kemik dokusunu harap eden tümörler meydana getirirler. Bu durum kemiklerin zayıflamasına ve kırıklara neden olabilir (90).

Lenfomalar; lenfoid doku kökenli hücrelerin yani lenfositler, makrofajlar ve bunlardan türemiş olan malign neoplazmalardır. Bu kanserler vücudumuzdaki bağışıklık sistemi elemanlarının anormal çoğalması sonucu gelişir. Hodgkin ve Non-Hodgkin olmak üzere iki tür lenfoma vardır (90).

Hodgkin lenfoma, lenf bezlerinden kaynaklanan, tedavi edilebilen bir kanser türüdür. Lenf dokusunda en sık görülen kanserdir. Vücudu enfeksiyonlara karşı koruyan sistemde yani lenf sisteminde oluşan kanser türüdür. Lenfositlerden oluşan lenf dokusunu etkiler. Lenf hücreleri çoğalır ve lenf bezleri büyür (91).

Non-Hodgkin lenfomada lenf sistemi içindeki hücreler anormal özellikler kazanır. Çok hızlı bölünür, düzensiz ve denetimsiz olarak büyürler. Bu tip kanser; bir lenften, bir sonraki lenf kümesine doğru yayılım gösterir (91).

2.4.1. Akut Myeloid Lösemi

AML, normal farklılaşma yeteneğini kaybeden hematopoetik kök hücrelerin heterojen bir klonal bozukluğudur. Hastalık, farklı prognozlara ve gen ifade profillerine sahip çeşitli sitogenetik ve moleküler anormalliklerle karakterizedir (92). Kemik iliğinde myeloid seriyi oluşturan blast adı verilen immatür hücreler olgunlaşamaz ve kemik iliği ile periferik kanda birikmeye başlar. Lösemik hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla normal hematopoez süreci baskılanır. Nötrofil, monosit gibi olgun hücreler meydana gelemediğinden mikroplara karşı vücut savunmasız kalır. Myeloblastların anormal çoğalması sonucu kemik iliğinde eritrosit ve trombosit yapımı bozulur (7).

AML erişkinlerde en sık rastlanan lösemi türüdür ve tüm lösemiler içerisinde en düşük sağ kalım oranına sahiptir. Her ne kadar genç yaş grubunda görülme oranı belirgin

şekilde artmış olsa da, yaşlı hastalarda prognoz daha kötü seyirlidir. AML'nin her 100000 kişide 3.8 olan prevalansı 65 yaş ve üstü olan her 100000 yetişkin için 17.9'a yükselmektedir. 2010 -2014 yılları arası yeni AML vakalarının sayısı, her 100000 erkek ve kadın için 4.2, ölümlerin sayısı 2.8 olarak belirtilmiştir. AML, batı dünyasındaki yetişkinlerde tüm lösemilerin yaklaşık %25'ini oluşturur ve bu nedenle en sık rastlanan lösemi türüdür (93). Dünya genelinde AML görülme sıklığı ABD, Avustralya ve batı Avrupa'da en yüksektir. AML, 15 yaş grubu vakaların yalnızca %15-%20'sini oluşturmaktadır (94). İngiltere'de tüm lösemilerin yaygın görülen vaka oranlarının dağılımı, hastaların %42.8'inin 65 yaşın üstünde olduğunu göstermektedir. AML tanısı alan hastaların medyan yaşının 65 olduğu bildirilmiştir. AML, 40 yaşından önce nadiren teşhis edilmekle birlikte, insidansı yaşla birlikte kademeli olarak artmaktadır. AML insidansı, cinsiyete ve ırka göre değişir. Yetişkinlerde AML, çoğu ülkede erkeklerde az bir oranla daha fazla görülmektedir (95).

Genel olarak AML hastaları; yorgunluk, morarma veya kanama, ateş ve enfeksiyon gibi çeşitli semptomlar gösterirler ve bir kemik iliği yetmezliği durumunu yansıtır. Bunun dışında; organomegali, lenfadenopati, sternal hassasiyet, retinal kanamalar ve diş eti, deri, yumuşak dokular veya meninkslerin infiltrasyonunu içeren durumlar gözlenebilir. AML'nin gelişimi birçok risk faktörü ile ilişkilendirilmiştir. Bu risk faktörleri, iyonize radyasyon, benzen ve sitotoksik kemoterapiye maruz kalmaktır. Ayrıca Bloom sendromu, Fankoni anemi, Kostmann sendromu, "Ataxia telangiectasia" ve "Wiscott-Aldrich" gibi kromatin bozuklukları ile Down (trizomi 21), Klinefelter (XXY ve varyantları) ve Patau (trizomi 13) gibi sendromlar AML gelişme riskini arttırmaktadır (96).

AML, kromozom anormallikleri, gen mutasyonları, çoklu genlerin ve ncRNA'ların ifadesindeki değişiklikler ile ilgili olarak yüksek oranda heterojenlik ile karakterize edilir. AML tanısı alan kişilerin yaklaşık %55'inde tanıda sitogenetik anormallikler vardır. Sitogenetik anormallikler; remisyon hızı, relaps ve genel sağ kalımı öngörmede en önemli prognostik faktörlerden biri olmuştur. AML'de en sık tekrarlanan t (8; 21) (q22; q22) veya inv (16) (p13; q22) sitogenetik anormallikleri iyi prognozu ifade etmektedir. Riskli hastalarda ise 5 veya 7 nolu kromozomun tamamı ya da bir kısmı, 11q23'ü içeren translokasyonlar ya da 3. kromozomda anormallikler görülmektedir (97). AML hastalarının neredeyse yarısında lösemik hücrelerde sitogenetik bir anormallik saptanamamıştır. Sitogenetik olarak normal olan AML hastaları "intermediate" (orta)

prognoz grubunda sınıflandırılmıştır; ancak bu grup oldukça heterojen olup tüm hastaların tedaviye cevabı aynı değildir. Hastaların yalnızca %40'ının uzun dönem sağ kalımının mümkün olduğu görülmüştür. Bu durum, bu grupta yer alan hastalarda olumlu ya da olumsuz bir prognoz ile ilişkili gen mutasyonları ve gen ifadesinde genetik değişkenliğin bir sonucu olarak görülmektedir. Tanıda klinik sonuçları öngörebilen, hastaların prognostik olarak sınıflandırılmasına yardımcı olan ve potansiyel olarak yeni ajanların hedefi olarak işlev gören belirteçlerin belirlenmesi gereklidir (98).

Gen ifade profili çalışmaları, bilinen kromozomal lezyonları ve genetik mutasyonları olan hastaları belirlemede kullanılacağı gibi normal sitogenetik AML alt gruplarını da tanımlamada kullanılabilir (99). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, AML hastalarında tekrarlayan somatik mutasyonları tanımlamıştır. FMS'ye bağlı tirozin kinaz 3 *FLT3*, nükleofosmin 1 *NPM1* ve *CEBPA* mutasyon analizinin, karyotipik anomalileri olmayan hastalar için risk oluşturduğu gösterilmiştir (100).

lncRNA ifade profilleri, tekrarlayan mutasyonlar ve klinik özelliklerin AML'deki prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. lncRNA'ların bir kısmının, lökemogenezide işlevsel bir role sahip olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, lncRNA'ların AML'de prognoz için biyolojik bir belirteç olarak kullanılabilmesi ifade edilmiştir. lncRNA ifadesine dayalı olarak tek başına standart tedaviyle komplet remisyona ulaşma olasılığı bulunan hastaların belirlenmesi, potansiyel olarak bu tür hastaları diğer toksisitelerden korur ve araştırmaya odaklar. Belirgin lncRNA profilleri; *FLT3* genindeki (*FLT3-ITD*) iç tandem duplikasyonlar ve *NPM1*, *CEBPA*, *IDH2*, *ASXL1* ve *RUNX1* genlerindeki mutasyonlar gibi seçili mutasyonlar ile bağlantılı olarak bulunmuştur (101).

AML'nin (French, American, British) FAB sınıflamasına göre 8 alt tipi mevcuttur (Tablo 2.1.). Bu sistemde tanı için temel kriter, kemik iliğindeki hücrelerin en az %30'unun myeloblastlardan oluşmasıdır. AML'nin standart FAB sınıflaması büyük ölçüde standart morfoloji ve basit sitokimyasal boya yöntemlerine dayanır. Ancak AML için prognostik önemi olan sitogenetik anomaliler, displastik değişimlerin varlığı veya daha önce kemoterapi görmüş olmak gibi faktörler göz önüne alınmaz (102).

Tablo 2.1. Akut Myeloid Lösemide FAB sınıflandırılması (102)

| FAB Alt Tipi | Özellikler |
|---|---|
| M0: Minimum farklılaşma gösteren AML | t(10;11), CALM-AF10, Blastların <%3'ünde MPO veya SB pozitifdir ancak akım sitometrisinde myeloid antijen ifadesi vardır. |
| M1: Olgunlaşma göstermeyen AML | Trizomi 11, MLL duplikasyonu myeloid hücrelerin >%90'ı blastik hücrelerden oluşur; blastların >%3'ü MPO ve SB ile boyanır. |
| M2: Olgunlaşma gösteren AML | t(8;21), Myeloid hücrelerin >%10'u promyelosit düzeyi veya daha geç evrede olgunlaşmıştır. Myeloblastların oranı >%30'dur. |
| M3: Akut promyelositer | t(15;17), t(11;17), t(5;17), Hipergranüler (%75): büyük stoplazmik granüller, promyelositler baskındır. Mikrogranüller (%25): küçük granülleri ve katlanmış çekirdekleri olan promyelositler baskındır. |
| M4: Akut myelomonositik | inv(16), Çevresel kanda monositoz; Kemik iliği hücrelerinin >%20'si monositik hücrelerden oluşur. |
| M5: Akut monositik lösemi • M5A • M5B | 11q23 translokasyonları, M5A: Kİ hücrelerinin >%80'i monoblastlardan oluşmuştur. M5B: Promonositler ön plandadır. |
| M6: Akut eritrolösemi | t(3;5), Kİ hücrelerinin >%50'si eritroid öncüllerden ve noneritroid hücrelerin >30'u myeloblastlardan oluşur. |
| M7: Akut megakaryositik lösemi | Myeloblastların >%50'si akım sitometri incelemesinde megakaryositik antijenleri ifade eder. |

MPO: Myeloperoksidaz, SB: Sudan Black, Kİ: Kemik iliği

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflaması prognostik ve tedaviye yönelik anlamı olan translokasyonların varlığına göre AML alt gruplarını ayırır. Aynı şekilde bu sınıflamada myelodisplastik sendromların varlığı ve daha önce kemoterapi görmüş

olmak (tedaviye bağı AML) gibi faktörler de dikkate alınmaktadır. WHO sınıflamasının FAB'dan önemli bir farkı, FAB'da %30 olan kemik iliğindeki blast oranının bu sınıflamada %20'ye indirilmiş olmasıdır. FAB sınıflamasında kemik iliğindeki myeloblast oranı %20-30 arasında olan olgular myelodisplastik sendrom olarak adlandırılmıştır. WHO sınıflamasında bu olgular AML olarak kabul edilmektedir (102).

2.4.2. Kronik Myeloid Lösemi

KML, sıklıkla Philadelphia (Ph) kromozomunu ve onkojenik BCR-ABL1 füzyon genini taşıyan hematopoetik kök hücrelerin myeloproliferatif bir bozukluğudur (103). KML, nispeten olgunlaşmış fakat yine de anormal beyaz kan hücrelerinin aşırı miktarda birikmesi ile karakterizedir. Ph kromozomu; 9 ve 22 nolu kromozomun uzun kolları arasındaki (t(9;22) (q34;q11)) karşılıklı bir kromozomal translokasyon sonucu oluşur. Bu translokasyon, 9.kromozomda ABL onkogeninin 22.kromozomda bulunan BCR genine kaynaşmasına neden olarak 22.kromozom üzerinde bir hibrid BCR-ABL onkogenini oluşturur. BCR-ABL füzyon geninin BCR-ABL transkriptleri, bu genin ürünü olan p210 peptidi, KML'nin patogenezinde rol oynayan yapısal olarak aktifleştirilmiş tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. BCR-ABL; MAPK, fosfatidilinositol 3 kinaz, JAK/STAT ve MYC de dahil olmak üzere, çoklu sinyal iletim yollarını aktive etmesiyle kontrolsüz hücre çoğalmasına, apoptozun baskılanmasına ve sonuçta kemik iliğindeki çeşitli biyolojik ve klinik özelliklerle karakterize edilmiş anormal pluripotent kök hücrelerin çoğalmasına neden olur. KML, Ph kromozomu olarak adlandırılan bu kromozomal sapma ile ilişkili ilk neoplazmadır ve diğer myeloproliferatif bozukluklarla bu translokasyonun varlığı kesin olarak ayırt edilebilir (104).

KML, her yıl yaklaşık 100000 kişi içinde 1 veya 2 vakada görülen nadir bir hastalıktır ve en yaygın olarak yaşlılarda görülür. Tanıda medyan yaş 65'dir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl ortalama 6000 yeni tanı öngörülmektedir (105). Belirgin coğrafi veya etnik farklılıklara bağlı olmamakla birlikte erkeklerde görülme oranı daha fazladır ve kadınlardaki sağ kalım oranı daha yüksektir (106). KML'nin moleküler patogenezi iyi anlaşılmıştır, ancak gen translokasyonuna yol açan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (4). Japonya'da Hiroşima ve Nagasaki atom bombasından sonra, KML insidansının artması nedeniyle radyasyon bir neden olarak gösterilmiştir. Ancak radyasyonun etkisinin düşük olduğu öngörülmektedir (107).

KML'nin takibi, blast hücre oranlarına dayanan üç ana bölüme ayrılır. Blastik hücre oranı %10'un altında ise kronik faz (CP), %10-19 arasında ise hızlandırılmış faz ve %20'nin üzerinde ise blast fazı (BP) olarak değerlendirilir. Hastaların çoğunluğunda sıklıkla asemptomatik olan ve yaklaşık olarak birkaç aydan 3-5 yıla kadar sürebilen CP fazında teşhis konur (108). Prognozun tedaviye yanıt ile korelasyonundan dolayı KML hastalarının hangi fazda olduğunun belirlenmesi önemlidir. Blast fazına geçen hastalarda Ph dışındaki ek kromozom anormalliklerinin sıklıkla görülmesi ve ek mutasyonların varlığı hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Ancak hastalığın progresyonundaki mekanizmalar ve blast fazına neden olan sitogenetik evrim büyük ölçüde bilinmemektedir (109).

Mevcut KML tedavileri, hidroksiüre, kemik iliği transplantasyonu veya tirozin kinaz inhibitörleri içerir. KML için yaygın olarak kullanılan ve oldukça etkili olan tedavi, BCR-ABL onkoproteininin kinaz aktivitesini inhibe eden tirozin kinaz inhibitörlerinden imatinib mesilat (IM) uygulamasıdır. BCR-ABL'yi hedef alan tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğu KML hastası için ilk basamak tedavidir ve KML prognozunu büyük ölçüde iyileştirmiştir. IM, yeni teşhis edilen KML hastalarının %80'inde tam bir hematolojik ve sitogenetik yanıt uyandıran, KML tedavisinin altın standardı olan, hedeflenen bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Bununla birlikte, KML hastalarının %20-25'i IM'ye dirençlidir veya tedavi sırasında direnç geliştirir. IM direnci ve intoleransı gelişen durumlar önemli bir klinik sorun oluşturmaktadır. IM direnci; BCR-ABL çoğalması, aşırı ifadesi veya BCR-ABL'nin tirozin kinaz alanındaki spontan mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkabilir. BCR-ABL'ye bağlı lösemik hücrelerin bağımsız proliferasyonuna yol açan nadir veya yeni sitogenetik sapmaların görülmesi ve hastalığın gelişimi nedeniyle IM'ye karşı direnç gelişebilir. Bazı KML hastaları da tirozin kinaz inhibitör tedavisine yanıtıdır ve başlangıçta yanıt veren hastaların önemli bir kısmında daha sonra ilaç direnci gelişebilmektedir. Tirozin kinaz inhibitör tedavisine karşı dirençle birkaç moleküler yol ilişkilendirilmiştir ancak ilaç direncinin gelişmesinin kesin mekanizması belirsizliğini korumaktadır (110).

Bununla birlikte, BCR-ABL füzyon geninin seyrek varyantlarını taşıyan hastalar, farklı klinik seyir ve prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu gibi durumlarda, IM intoleransı ve direncinin tanınması ve tedavi sonuçlarının izlenmesi daha da zorlaşmaktadır. Hastaların ilaç direncinin düzenli izlenmesi ve IM cevabının pratik olarak izlenmesi, tedavi seçiminde kılavuzluk etmek ve hastalara uzun vadeli daha iyi sonuçlar

verebilmek için kullanılabilir. Bu nedenle son yıllarda, tanıda klinik sonuçları öngörebilen, hastaların prognostik olarak sınıflandırılmasına yardımcı olan ve IM direncini öngörmek ve yönetmek için çoklu potansiyel biyolojik markırların belirlenmesi üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır (103).

Hastalığın daha iyi anlaşılmasını ve KML hastalarına terapötik müdahalenin geliştirilmesine yardımcı olmak için KML'nin farklı evrelerinde doğrulanmış olan miRNA ve lncRNA dizilerinin profilini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Tüm KML evrelerinde çok sayıda eksprese edilen miRNA ve lncRNA'ların varlığı belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda KML'de imatinib direncinin mekanizmalarının alta yatan sebeplerinin daha iyi anlaşılabilmesi için lncRNA'ların ifade profilleri araştırılmaktadır (111).

2.5. REAL TIME PCR

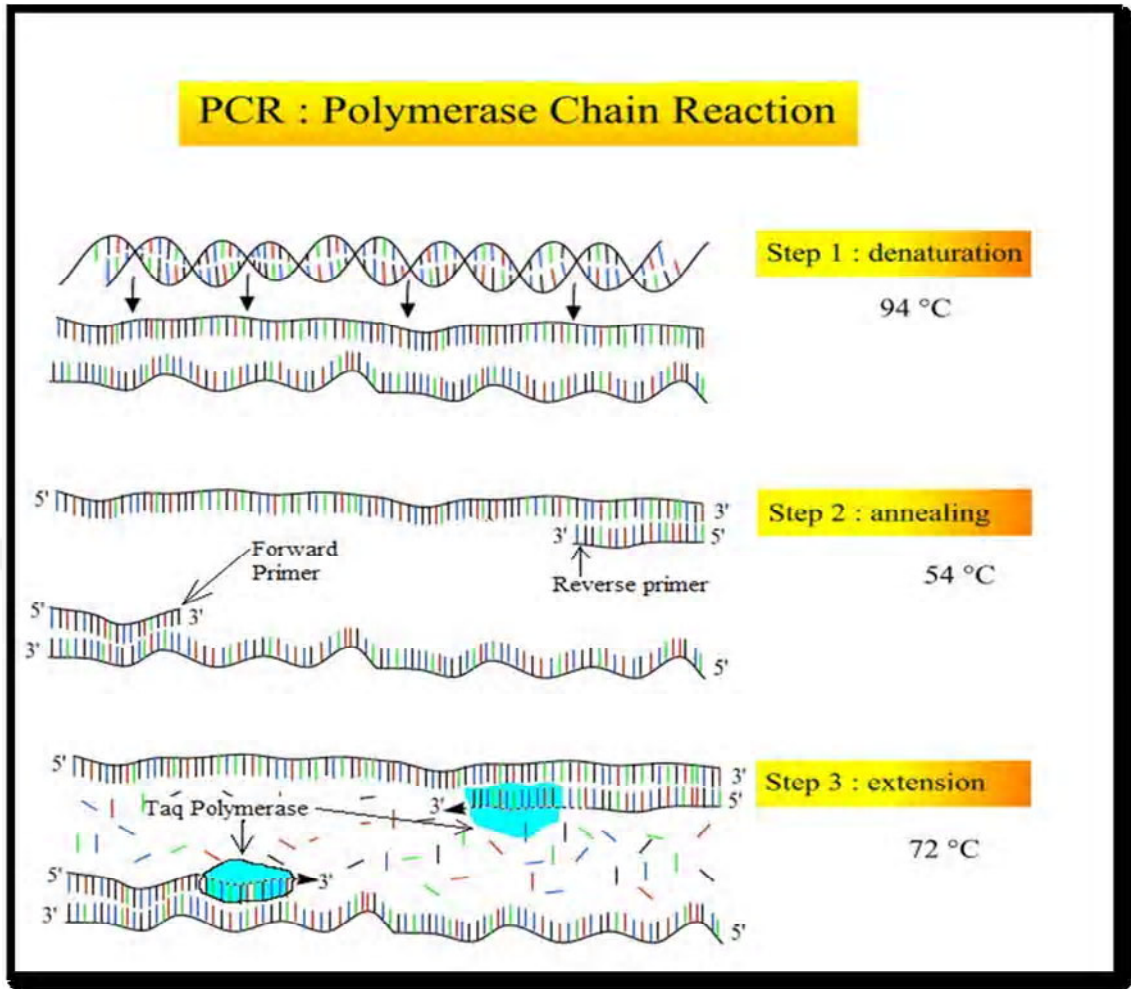
DNA; genetik bilgiyi nükleotidlerin sekansında şifrelemiş olarak saklayan, fosforik asit doeksriboz ünitelerinin oluşturduğu iki paralel zincirin, pürin ve pirimidin bazlarının çapraz olarak bağlanmasıyla ortaya çıkan sağ yönlü sarmal yapıya sahip bir moleküldür. 1953 yılında Watson ve Crick tarafından üç boyutlu moleküler yapısı tanımlanmıştır. Genlerden oluşan DNA, kromozomlarda sıkı bir şekilde paketlenmiştir. DNA molekülleri çok uzundur. Tek bir molekül çok sayıda gen taşır, ve genler kromozomal DNA'nın küçük bir kısmını işgal eder. Özgül genlerin doğrudan çalışabilmesi için gen boyutundaki DNA parçalarının çok sayıda kopyasının elde edildiği yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur (112).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan *in vitro* bir tekniktir. İlk olarak Kary Mullis bu tekniğe bugünkü ismini vermiş ve uygulamaya koymuştur ve bu fikri ile 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır (113).

PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.

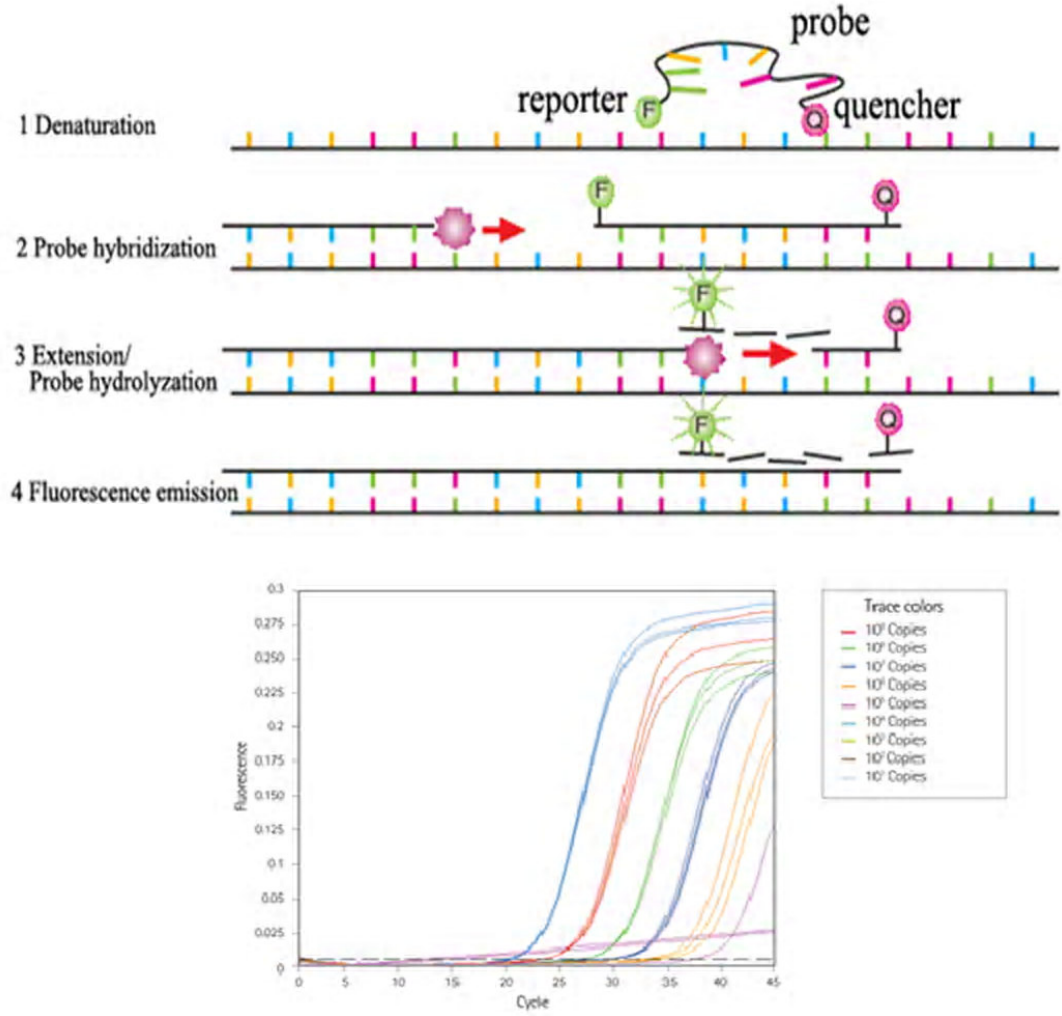
Denatürasyon (90-95 °C), Primer bağlanması (50-70 °C), DNA sentezi (70-75 °C).

Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur (Şekil 2.3.) (114).



Şekil 2.3. Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik olarak gösterilmesi (114)

Real Time PCR ise “PCR” çoğaltımını görünür hale getiren ve monitörize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın; oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Termal döngü cihazı ve florimetre aynı cihaz üzerinde bulunur. Bilgisayar programı ile sıcaklık döngüleri ayarlanır ve izlenir (Şekil 2.4.) (115).



Şekil 2.4. Floresan işaretli prob ile Real Time PCR işlemi (115)

Problar, florofor denilen ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında floresan ışımaya yayabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotidlerdir. Genel olarak bakıldığında prob dizileri, PCR tüpü içerisinde çoğaltma işlemi gerçekleşirken, çoğaltılmış olan hedef DNA zincirlerine bağlanarak floresan ışımaya oluşmasına neden olurlar. PCR ürünü ile floresan yoğunluğu arasında korelasyon vardır (116).

Real Time PCR sisteminde DNA'ya özgül olmadan bağlanan boyalar ve zincire özgül yöntemlerde floresan problar kullanılarak çoğaltılan DNA miktarı, oluşan sinyal şiddetiyle değerlendirilmektedir (115).

DNA dizisinde meydana gelen mutasyonlar dışındaki sebeplerden dolayı gen ifadelerinde değişiklikler meydana gelebilmektedir. Real Time PCR yöntemi organ, doku ve hücrelerin mRNA düzeyinde incelenebilmesi ve özgül olarak gen düzeyinde kantitatif analiz fırsatı vermektedir (117).

Real Time PCR uygulamalarında eşik döngü değeri (threshold cycle, Ct) önemli bir parametredir. Ct değeri, floresan artışın önemli olduğu ilk siklusu ifade eder. Kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait Ct değerleri ile, incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak kantitasyon yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. İyi ifade sağlayan bir örneğin seri dilüsyonları standart olarak kullanılabilir. Farklı PCR işlemlerinde yer alan kalıp örneklerin miktarı Ct değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir. Bu standartlar kullanılarak, atfedilen konsantrasyon değerlerine karşılık gelen dilüsyonların Ct değerleri belirlenerek kantitasyon için gerekli olan regresyon eğrisi çizilir. Standart örnek olarak içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara mutlak kantitasyon adı verilir. Bu eğri, standart eğri olarak da ifade edilmektedir. Kantitasyon aşamasında, örneklerin Ct değerlerinin regresyon eğrisi üzerinde hangi atfedilen değeri temsil ettiklerine bakılarak da göreceli bir miktar belirlenir. Bu şekilde kantitatif PCR verilerinin analizinde; mutlak ve göreceli kantitasyon kullanılabilir (118).

Göreceli kantitatif Real Time PCR uygulamalarında normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifadesi değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (118).

Bir hücrenin temel işlevsel ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tümünde eksprese olan ve ifade seviyesi dokudan dokuya değişmeyen genlere referans genler adı verilir. Referans genler hücrenin işleyişini düzenleyen genler olarak da ifade edilmektedir (119). Özellikle farklı bireylerden alınan ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan çalışmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gereklidir. Bu oranlamayla amaçlanan; izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını ve deneysel hataları normalize etmektir.

İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan referans genin ifade düzeyine oranlanarak hedef genin ifade profili hakkında göreceli kantitasyon yapılır (118).

Real Time PCR cihazları arasındaki temel farklılıklar “eksitasyon” ve “emisyon” dalga boyları, hızı ve aynı anda paralel gidebilen reaksiyon kapasiteleridir.

Roche Lightcycler 480 II Real Time PCR cihazı ise hızlı PCR yapabilecek altyapıya sahiptir ve 96'lık blok içermektedir. 440, 465, 498, 533, 618 nm dalga boylarında 5 adet eksitasyon filtresine ve 488, 510, 580, 610, 640, 660 nm dalga boylarında 6 adet emisyon filtresine sahiptir. Cihazın plate sistemi, tüm kuyucuklarda 0.08 nm floresans boyayı tespit edebilecek hassasiyettedir. Cihaz, "SYBR Green I", "Taqman Hidroliz Problemleri", "Hibridizasyon Problemleri (FRET)", "Simple Probe" Problemleri, "UPL" problemleri gibi farklı assay (deneme) formatları ile çalışabilir (Şekil 2.5.) (120).



Şekil 2.5. Roche Lightcycler 480 II Real Time PCR cihazı (120)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, TYL-2016-6245 numaralı proje olarak Erciye Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiş ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır (2015/222, karar tarihi: 08.05.2015).

Araştırmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Tıbbi Genetik Laboratuvarına gelen 18 ile 75 yaş arası yeni tanı alan 30 AML ve 30 KML hastasının ve kontrol grubu olarak da 18 ile 75 yaş arası 20 sağlıklı bireyin periferik kan örnekleri kullanıldı. EDTA'lı tüpe alınan 4 mL periferik kan örneklerinden total RNA izole edilip, cDNA sentezi yapıldı. Real Time PCR yöntemi ile *HOTAIR* ve *HOXD* genlerinden *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin mRNA seviyeleri belirlendi.

Gen ifadesi çalışmalarında Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) Real Time PCR cihazı kullanıldı. Analizler, Lightcycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile yapıldı.

3.1. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar; Hettich universal D-7200 santrifüj cihazı (Hettich-Universal Tuttlingen, Germany), PCR cihazı; “Rotor Gene 6000 Real-Time PCR Machine” (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya), Hettich mikro 200R mikro santrifüj cihazı (Hettich-Universal Tuttlingen, Germany), Lightcycler 480 II Real Time PCR Cihazı (Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland), LightCycler 480 Multiwell Plate (Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) , 1-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL otomatik pipetler (Gilson, P10N, P100N, P1000N), vorteks cihazı (Heidolph Reax Control Vortex), falkon tüpü 50 mL (Isolab GmbH), PCR tüpleri 0,2 mL (Isolab GmbH), ependorf tüpleri 2 mL (Isolab GmbH), enjektör 2mL (Isolab GmbH), NanoDrop 2000c spektrofotometre (Thermo Scientific).

3.1.2. RNA izolasyonu ve İfade Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler

TriPure Isolation Reagent 200 mL (Roche), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche), LightCycler 480 Probes Master (Roche), *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* ve *Beta actin* genlerine spesifik primerler (RealTime ready Katalog Assays gen reaksiyon, Roche), RealTime ready cDNA Pre-Amp Master (Roche), RNAase-Free Water 10x50 mL (Qiagen), %96'lık etil alkol, kloroform, red cell lizis solüsyonu (amonyum klorid, potasyum bikarbonat, EDTA, distile su), izopropanol.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Lökosit İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüpe alınan 4 mL periferik kan örneğinden Trizol reagent metoduna göre lökosit ve total RNA izolasyonu yapıldı.

1. Kan numuneleri 50 mL'lik falkon tüplere aktarıldı.
2. Falkon tüpe 25-30 mL Red Cell Lizis solüsyonu eklendi.
3. 15-20 dakika +4⁰C'de inkübe edildi. Süre sonunda 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrasında, falkon tüpte oluşan süpernatant kısım atıldı. Pellet kısmına 15-20 mL Red Cell Lizis solüsyonu eklendi ve homojenize edildi.
5. Daha sonra +4⁰C'de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı, pellet etrafındaki eritrositler 1000 µL'lik ve 100 µL'lik steril pipet uçlarla temizlendi.
7. Daha sonra 1 mL Trizol eklenip enjektör yardımıyla homojenize edildi.
8. Örnekler falkon tüpten, etiketlenen 2 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı ve -20⁰C'ye kaldırıldı.

3.2.2. Lökositten Total RNA İzolasyonu

1. -20⁰C'de saklanan ve izole edilen lökositler oda sıcaklığında erimeye bırakıldı. Erime işlemi tamamlandıktan sonra tekrar enjektör yardımıyla homojenize edildi.
2. Tüpler 37⁰C 'de 3 ile 5 dakika arasında inkübasyona tâbi tutuldu. Her bir tüpe 200 µL kloroform eklenerek vortekslendi.

3. Daha sonra 12000 g'de 15 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Bu aşamadan sonra -20°C soğuk blokla çalışmaya devam edildi.
4. Oluşan aköz faz pipetle dikkatlice etiketlenen farklı bir ependorf tüpe aktarıldı. Her bir tüpe 500-650 µL izopropanol eklenip resüspanse edilerek, -20°C'de 30 dakika inkübe edildi.
5. Süre sonunda 12000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant dikkatlice alınıp atıldı, pellet üzerine 1 mL etanol eklendi ve resüspanse edildi.
6. Daha sonra 7500 g'de 5-6 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
7. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım dikkatlice atıldı, tüpler alkolün uçması için ağzı açık şekilde oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletildikten sonra 37°C'de 2 ile 3 dakika arasında inkübasyona tabi tutuldu.
8. Pellette bulunan RNA miktarına göre nükleaz free water eklendi. RNA konsantrasyonları ölçülerek -20°C'de saklandı.

3.2.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak yapıldı.

1. RNA örnekleri; konsantrasyonları 400-600 ng/µL olacak şekilde her bir hasta için yeni PCR tüplerine RNAase Free Water eklenerek dilüe edildi.
2. Kit içeriğindeki ürünler (RNase inhibitör ve reverse transkriptaz hariç) soğuk blok üzerinde çözülmeye bırakıldı.
3. Vortekslenip kısa santrifüj yapıldı. RNase inhibitör ve reverse transkriptaz kullanılacağı zaman soğuk blok üzerine çıkarılmasına özen gösterildi.
4. cDNA sentezi için örnek sayısının bir fazlası kadar karışım hazırlandı. Tablo 3.1.'deki miktarlara göre 1. karışım oluşturuldu.

Tablo 3.1. cDNA Reaksiyonu için Hazırlanan 1. Karışım

| Madde | Örnek başına eklenecek hacim | Toplam |
|-------------------|------------------------------|----------------|
| Random primer | 2 µL | 2 x (ÖS + 1) |
| dH ₂ O | 4,4 µL | 4,4 x (ÖS + 1) |
| Karışım | 6,4 µl | 6,4 x (ÖS + 1) |

ÖS:Örnek sayısı

- Hazırlanan karışımdan 6,4 µL, örnek sayısı kadar yeni PCR tüplerine dağıtıldı.
- Bu tüplere, seyreltilen RNA' lardan 5 µL eklendi ve 65⁰C'de 10 dakika beklemesi için thermal cycler cihazına konuldu. Tablo 3.2.'deki miktarlara göre 2. karışım hazırlandı.

Tablo 3.2. cDNA Reaksiyonu için Hazırlanan 2. Karışım

| Madde | Örnek başına eklenecek hacim | Toplam |
|-------------------------|------------------------------|----------------|
| 5X Buffer (Tampon) | 4 µL | 4 x (ÖS + 1) |
| dNTP, 10mM | 2 µL | 2 x (ÖS + 1) |
| RNase İnhibitör, 40U/µl | 0,5 µL | 0,5 x (ÖS + 1) |
| Reverse Transkriptaz | 1,1 µL | 1,1 x (ÖS + 1) |
| DTT, 0,1 M | 1 µL | 1 x (ÖS + 1) |
| Karışım | 8,6 µL | 8,6 x (ÖS + 1) |

ÖS: Örnek sayısı

- Hazırlanan karışım, termal cycler'dan alınan örneklere 8,6 µL olacak şekilde dağıtıldı. Her bir reaksiyon tüpünde son hacim 20 µL (6,4+5+8,6) idi.
- cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon tüpleri Tablo 3.3.'de belirtilen inkübasyon sürelerine göre thermal cycler'da bekletildi.

Tablo 3.3. cDNA Sentezi için Gerekli Sıcaklık Döngüsü

| Sıcaklık (°C) | Süre |
|---------------|-----------|
| 29 °C | 10 Dakika |
| 48 °C | 60 Dakika |
| 85 °C | 5 Dakika |
| 4 °C | ∞ |

9. Elde edilen cDNA ürünleri -20°C 'de muhafaza edildi.

3.2.4. PreAmp cDNA Sentezi

PreAmp cDNA sentezi, RealTime ready cDNA Pre-Amp Master (Roche) kiti kullanılarak yapıldı.

Roche RealTime ready Katalog Assays gen reaksiyon HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 ve Beta actin genlerine ait spesifik primerlerin dizilimleri Tablo 3.4.'de gösterildi.

Tablo 3.4. Beta Actin, HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 genler için kullanılan primer dizilimleri

| Primer Adı | İleri Dizi (Forward) | Geri Dizi (Reverse) |
|------------|------------------------------|-------------------------------|
| Beta Actin | 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' | 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3' |
| HOTAIR | 5'-GGGTGTTGGTCTGTGGAAC-3' | 5'-CAGTGG-GGAACTCTGACTCG-3' |
| HOXD8 | 5'-GTCCAGTGTAATATTGGCGAGG-3' | 5'-GCGACTGTAGGTTTGTCTTCCTC-3' |
| HOXD9 | 5'-AGGAGGAGAAGCAGCATTGCA-3' | 5'-CTTCTCCAGCTCAAGCGTCTG-3' |
| HOXD11 | 5'-CAGTCCCTGCACCAAGGCGAC-3' | 5'-GGTATAGGGACAGCGCTTTTCC-3' |

Çalışmaya başlamadan önce gen ifadesinde kullanılacak olan primerler 1/10 oranında kit içerisinde bulunan dH₂O ile dilüe edildi ve karışım hazırlanma aşamasına geçildi. Tablo 3.5.'deki miktarlara göre karışım hazırlandı.

Tablo 3.5. PreAmp cDNA Sentezi için Hazırlanan Karışım

| Madde | Örnek başına eklenecek hacim | Toplam |
|---|--|-------------------------|
| Mastermix RealTime ready cDNA Pre-Amp | 5 µL | 5 x (ÖS + 1) |
| dH ₂ O | 8 µL | 8 x (ÖS + 1) |
| Prob (HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11, Beta actin) | Her primer için (1/10) 1,4 µL (1,4 µL x 5) | (1,4 x 5) x (ÖS + 1) |
| Karışım | 20 µL | 20 x (ÖS + 1) |

ÖS: Örnek sayısı

Daha sonra, PreAmp cDNA sentezi için PCR tüpleri hazırlandı. Tüplere dağıtılan 20 µL karışım içerisine 5 µL cDNA'lar eklendi ve Tablo 3.6.'da belirtilen inkübasyon sürelerine göre thermal cycler'da bekletildi.

Tablo 3.6. PreAmp cDNA Sentezi için Gerekli Termal Döngü Koşulları

| Sıcaklık (°C) | Süre | Döngü |
|---------------|-----------|-------|
| 95 °C | 1 Dakika | 1 |
| 95 °C | 15 Saniye | 13 |
| 60 °C | 13 Saniye | 13 |
| 4 °C | ∞ | |

Sentezlenen PreAmp cDNA ürünlerinden 5 µL, yeni etiketlenen tüplere alındı ve üzerlerine 195 µL RNAase-Free Water eklenerek 1/40 oranında dilüe edildi.

Elde edilen tüm ürünler -20⁰C 'de muhafaza edildi.

3.2.5. Real Time PCR ile Hedef Genlerin İfade Düzeylerinin Kantitatif Olarak Saptanması

Gen ifadesi ölçümleri, LightCycler 480 Probes Master kiti (Roche) kullanılarak Lightcycler 480 II (Roche Diagnostics Ltd. Rotkreuz, Switzerland) PCR cihazı ile yapıldı. Analizler Lightcycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile değerlendirildi.

1. Her hasta ve kontrol örneği iki defa tekrarlanarak çalışıldı. Her çalışmada iki adet negatif kontrol ve kalibratör kullanıldı. Tüm örneklerde *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ayrı ayrı ifade seviyeleri belirlendi.
2. Her gen için ayrı karışım hazırlandı. Referans gen olarak *Beta-actin* kullanıldı.
3. Gen ifade analizleri, 1/40 dilüe edilen PreAmp cDNA ürünleri kullanılarak yapıldı.
4. Gen ifade analizi için örnek başına hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.7.'de belirtilen miktarlara göre hazırlandı.

Tablo 3.7. Gen İfadesi Reaksiyon Karışımı

| Madde | Her bir kuyucuğa eklenecek miktar (μL) |
|--|---|
| Mastermix (LightCycler 480 Probes Master) | 10 μL |
| dH ₂ O | 4 μL |
| Real time ready assay (primer prob) | 1 μL |
| Toplam Miktar | 15 μL |

5. Çalışma planına göre plate üzerindeki kuyucuklara 15'er μL karışım dağıtıldı.
6. Daha sonra 1/40 dilüe edilen PreAmp cDNA ürünlerinden 5 μL karışımlar üzerine eklendi.
7. Plate'in üzeri optik bant ile kapatıldı.
8. Plate, "perfect spin" ile santrifüj edildikten sonra Lightcycler 480 II Real Time PCR cihazına Tablo 3.8.'de gösterilen sıcaklık ve süreler göre yüklendi.

Tablo 3.8. Lightcycler 480 II Real Time PCR Cihazında Ayarlanan Sıcaklık ve Süreler

| Basamak | Döngü Sayısı | Sıcaklık (°C) | Sıcaklık artış/azalış hızı (°C) | Süre (Saniye) |
|---------------|--------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| Preinkübasyon | 1 | 95 | 4,4 | 600 |
| Amplifikasyon | 45 | 95 | 4,4 | 10 |
| | | 60 | 2,2 | 30 |
| | | 72 | 4,4 | 1 |
| Soğutma | 1 | 40 | 2,2 | 30 |

Real Time PCR işlemi sonrası sonuçlar, Lightcycler 480 Software (release 1.5.0 SP4) programı ile analiz edildi.

3.3. İSTATİSTİK

Çalışmada hasta ve kontrol örneklerinde çalışılan gen ifadeleri arasındaki istatistiksel farklılık *T* testi yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı ve p değerleri hesaplandı. Elde edilen verilerin analizi SPSS 15.0 (Statistical Package for Social Science, Chicago, ILL) yazılımı ile değerlendirildi. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Optimizasyon

Hasta gruplarından ve sağlıklı kişilerden toplanan periferik kan örneklerinde cDNA sentezi aşaması sonrası gen ekspresyonu ölçümü için ön denemeler yapıldı. Çalışmanın optimizasyonu için öncelikle iki kontrol örneği ve iki hasta örneğinde referans gen olan *Beta-actin* ile birlikte *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinde Real Time PCR işlemi yapıldı. Yapılan analizlerde, çalışmayı hedeflediğimiz *HOTAIR* geninde sağlıklı kontrol ve hasta örneklerinde görülen floresan yoğunluğun belirgin bir şekilde görüldüğü nokta olan “Cp” (crossing points, geçiş noktaları) değerlerinin referans değerler arasında olmadığı görüldü. Hedef genlerimizde Real Time PCR sonrası sağlıklı bir kantitasyon yapabilmek için PreAmp cDNA sentezi çalışması yapıldı. PreAmp cDNA örneklerinden yapılan Real Time PCR işleminde, her transkript için Cp analizinin uygun şekilde yapılabildiği görüldü. Tüm cDNA örneklerinde PreAmp cDNA sentezi yapıldı ve daha sonra Real Time PCR ile gen ifadesi ölçümü aşamasına geçildi.

4.2. Kontrol Grubunda Yaş ve Cinsiyet Dağılımı ile İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonları

Kontrol grubu yaş ortalaması $34,95 \pm 9,59$ olan 18 ile 65 yaş aralığında 13'ü erkek 7'si kadın 20 sağlıklı bireyden oluştu (Tablo 4.1.). Kontrol grubunda EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları da Tablo 4.1.'de verildi.

Tablo 4.1. Kontrol grubunda yaş, cinsiyet dağılımı ve ölçülen RNA konsantrasyonları

| Kontrol No | Cinsiyet | Yaş | RNA konsantrasyonu (ng/ μ L) |
|------------|----------|-----|----------------------------------|
| K1 | E | 28 | 243 |
| K2 | E | 32 | 354 |
| K3 | K | 45 | 425 |
| K4 | K | 38 | 898 |
| K5 | K | 25 | 1410 |
| K6 | K | 23 | 184 |
| K7 | K | 31 | 431 |
| K8 | K | 28 | 428 |
| K9 | E | 32 | 661 |
| K10 | E | 43 | 130 |
| K11 | E | 54 | 1336 |
| K12 | K | 35 | 373 |
| K13 | E | 46 | 1317 |
| K14 | E | 28 | 1017 |
| K15 | E | 27 | 558 |
| K16 | E | 57 | 870 |
| K17 | E | 31 | 867 |
| K18 | E | 34 | 788 |
| K19 | E | 37 | 544 |
| K20 | E | 25 | 248 |

K: Kadın E: Erkek

4.3. AML Hasta Grubunda Yaş, Cinsiyet ve Mutasyonların Dağılımı ile İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonları

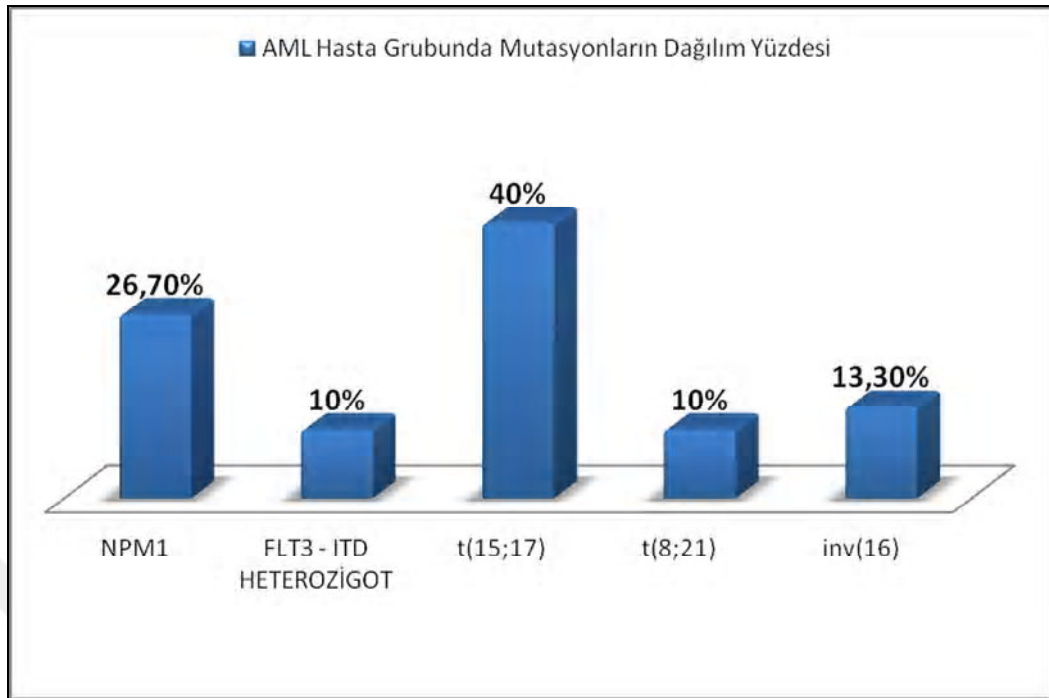
AML hasta grubu yaş ortalaması $42,07 \pm 18,18$ olan 18 ile 65 yaş aralığında 20'si erkek, 10'u kadın olmak üzere 30 hastadan oluştu (Tablo 4.2.). AML hasta grubunun periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları da Tablo 4.2.'de verildi.

Tablo 4.2. AML hasta grubunun yaş, cinsiyet, mutasyonları ve ölçülen RNA konsantrasyonları

| Hasta No | Cinsiyet | Yaş | Mutasyon tipi | RNA konsantrasyonu (ng/μL) |
|----------|----------|-----|---------------|----------------------------|
| H1 | E | 42 | NPM1 | 1004 |
| H2 | E | 61 | t(15;17) | 1057 |
| H3 | E | 57 | NPM1 | 1044 |
| H4 | E | 12 | t(15;17) | 995 |
| H5 | E | 76 | t(15;17) | 1090 |
| H6 | E | 90 | FLT-3 | 1072 |
| H7 | E | 41 | FLT-3 | 610 |
| H8 | E | 56 | MPM1 | 325 |
| H9 | E | 26 | t(15;17) | 1434 |
| H10 | K | 22 | t(15;17) | 959 |
| H11 | E | 32 | t(15;17) | 1106 |
| H12 | E | 55 | t(15;17) | 422 |
| H13 | E | 49 | t(15;17) | 553 |
| H14 | E | 23 | t(15;17) | 810 |
| H15 | K | 40 | MPM1 | 767 |
| H16 | E | 39 | FLT-3 | 1290 |
| H17 | E | 18 | inv(16) | 868 |
| H18 | K | 61 | MPM1 | 1618 |
| H19 | K | 65 | MPM1 | 841 |
| H20 | K | 19 | inv(16) | 1028 |
| H21 | E | 54 | t(15;17) | 858 |
| H22 | K | 25 | inv(16) | 1817 |
| H23 | K | 38 | t(8;21) | 1045 |
| H24 | E | 23 | t(8;21) | 671 |
| H25 | E | 41 | t(8;21) | 1078 |
| H26 | K | 50 | MPM1 | 1247 |
| H27 | E | 24 | inv(16) | 1106 |
| H28 | K | 50 | MPM1 | 893 |
| H29 | E | 37 | t(15;17) | 900 |
| H30 | K | 30 | t(15;17) | 841 |

K: Kadın E: Erkek

AML hasta grubunu oluşturan örneklerin mutasyon dağılım yüzdeleri Şekil 4.1.'de, klinikopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılması Tablo 4.3.'de verildi



Şekil 4.1. AML hasta grubunda mutasyonların dağılım oranları

Tablo 4.3. AML hasta grubun klinikopatolojik özelliklerine göre sınıflandırılması

| Klinikopatolojik özellikler | N | Prognostik Kriter |
|-------------------------------|----|-------------------|
| Cinsiyet | | |
| Kadın | 10 | |
| Erkek | 20 | |
| Sitogenetik anomaliler | | |
| t(8;21) (AML-M2) | 3 | İyi Risk Grubu |
| t(15;17) (AML-M3) | 12 | |
| inv(16) (AML-M4) | 4 | |
| Moleküler anomaliler | | |
| NPM1 Mutasyonu | 8 | Orta Risk Grubu |
| FLT3-ITD Heterozigot Mutasyon | 3 | Kötü Risk Grubu |

N: Örnek sayısı

4.4. KML Hasta Grubunda Yaş, Cinsiyet ve Mutasyonların Dağılımı ile İzole Edilen RNA'ların Konsantrasyonları

KML hasta grubu yaş ortalaması $48,03 \pm 19,90$ olan 18 ile 65 yaş aralığında 17'si erkek 13'ü kadın olmak üzere 30 hastadan oluştu (Tablo 4.4.) KML hasta grubunun periferik kan örneklerinden izole edilen RNA'ların konsantrasyonları da Tablo 4.4.'de verildi.

Tablo 4.4. KML hasta grubunun yaş, cinsiyet dağılımı ve ölçülen RNA konsantrasyonları

| Hasta No | Cinsiyet | Yaş | Mutasyon tipi | RNA konsantrasyonu (ng/ μ L) |
|----------|----------|-----|---------------|----------------------------------|
| H31 | E | 23 | t(9;22) | 1850 |
| H32 | K | 34 | t(9;22) | 1067 |
| H33 | E | 56 | t(9;22) | 1159 |
| H34 | E | 61 | t(9;22) | 945 |
| H35 | E | 18 | t(9;22) | 535 |
| H36 | K | 30 | t(9;22) | 703 |
| H37 | K | 73 | t(9;22) | 1054 |
| H38 | E | 75 | t(9;22) | 1614 |
| H39 | K | 60 | t(9;22) | 1068 |
| H40 | E | 18 | t(9;22) | 1366 |
| H41 | K | 46 | t(9;22) | 535 |
| H42 | K | 20 | t(9;22) | 452 |
| H43 | E | 74 | t(9;22) | 427 |
| H44 | K | 59 | t(9;22) | 846 |
| H45 | K | 62 | t(9;22) | 1083 |
| H46 | E | 58 | t(9;22) | 1335 |
| H47 | E | 20 | t(9;22) | 799 |
| H48 | K | 75 | t(9;22) | 835 |
| H49 | E | 58 | t(9;22) | 1589 |
| H50 | E | 81 | t(9;22) | 1310 |
| H51 | K | 46 | t(9;22) | 477 |
| H52 | E | 26 | t(9;22) | 923 |
| H53 | K | 75 | t(9;22) | 922 |
| H54 | E | 36 | t(9;22) | 1199 |
| H55 | E | 45 | t(9;22) | 1333 |
| H56 | E | 48 | t(9;22) | 568 |
| H57 | K | 57 | t(9;22) | 411 |
| H58 | E | 31 | t(9;22) | 1272 |
| H59 | E | 26 | t(9;22) | 620 |
| H60 | K | 50 | t(9;22) | 1041 |

K: Kadın E: Erkek

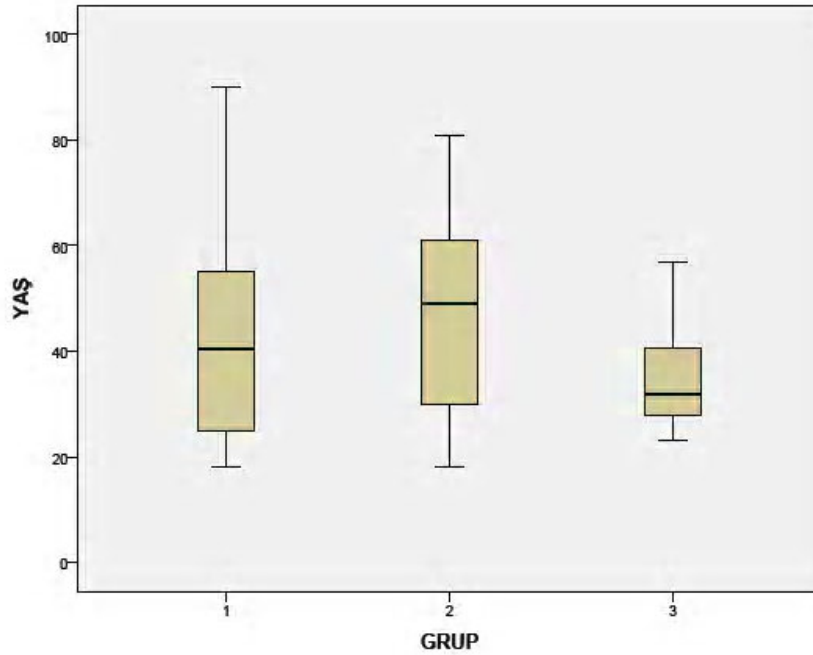
4.5. Kontrol ve Hasta Gruplarında Yaş ve Cinsiyet Dağılımları

Çalışmaya alınan kontrol ve hasta gruplarındaki örneklerin yaş ortalaması ve standart sapma değerleri Tablo 4.5.'de verildi. Kontrol ve hasta gruplarının yaş dağılımı Şekil 4.2.'de gösterildi. Yaş dağılımı göz önünde bulundurulduğunda kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Kontrol ve hasta gruplarında yaş dağılımı

| Grup | | | p |
|-------------------|---------------|---------------|-------|
| Kontrol (N:20) | AML (N:30) | KML (N:30) | |
| 34,95±9,59 | 42,07±18,18 | 48,03±19,90 | >0.05 |

Veriler (Ortalama \pm Standart Sapma) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı



Şekil 4.2. AML (1), KML (2) ve Kontrol (3) gruplarında yaş dağılımlarının görünümü

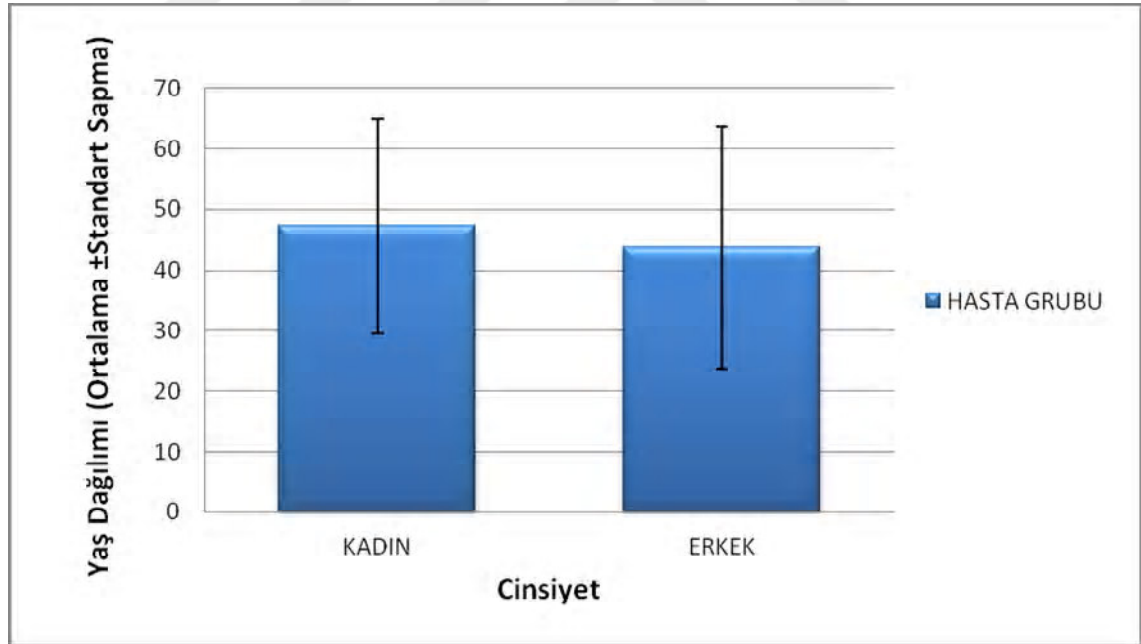
AML ve KML hasta grubu, toplamda 23'ü kadın 37'si erkek olmak üzere 60 kişiden oluştu. Hasta gruplarında, cinsiyete göre yaş dağılımları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Hasta gruplarında cinsiyetler arası yaş dağılımı

| Cinsiyet | AML ve KML Hasta Grupları (N:60) | p |
|----------|-------------------------------------|-------|
| Erkek | 43,68 ±20,07 | >0.05 |
| Kadın | 47,26 ±17,75 | |

Veriler (Ortalama ± Standart Sapma) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı

AML ve KML hasta gruplarında cinsiyete göre yaş dağılımları Şekil 4.3.'de gösterildi.



Şekil 4.3. Hasta gruplarında cinsiyetler arası yaş dağılım grafiği

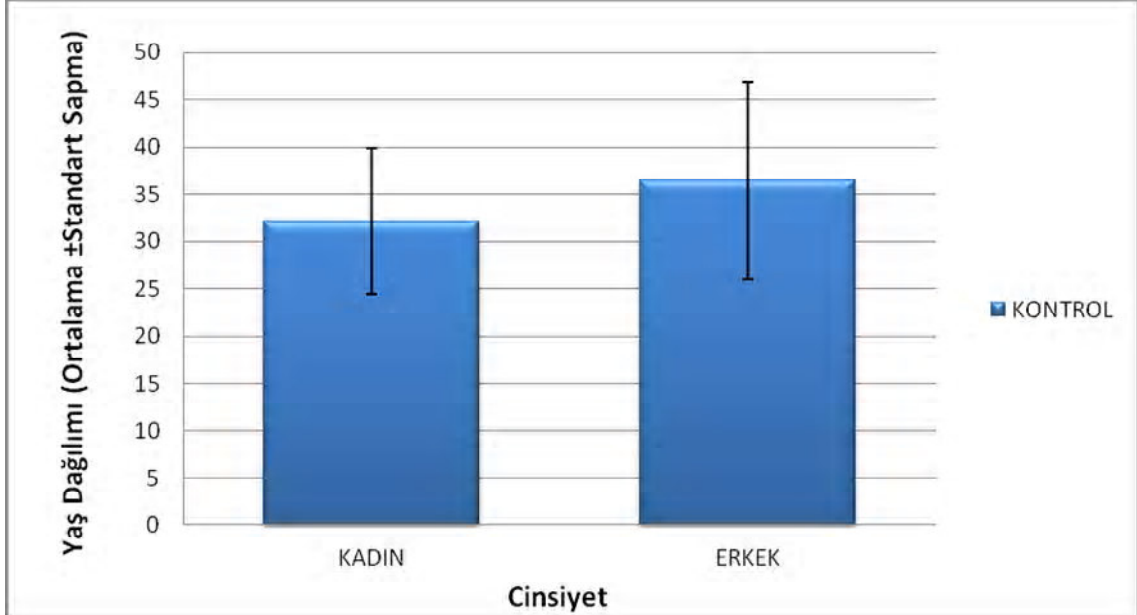
Kontrol grubu 13'ü erkek 7'si kadın 20 sağlıklı bireyden oluştu. Kontrol grubunda, cinsiyete göre yaş dağılımları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Kontrol grubunda cinsiyetler arası yaş dağılımı

| Cinsiyet | Kontrol Grubu (N:20) | p |
|----------|-------------------------|-------|
| Erkek | 36,46 ±10,42 | >0.05 |
| Kadın | 32,14 ±7,75 | |

Veriler (Ortalama ± Standart Sapma) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı

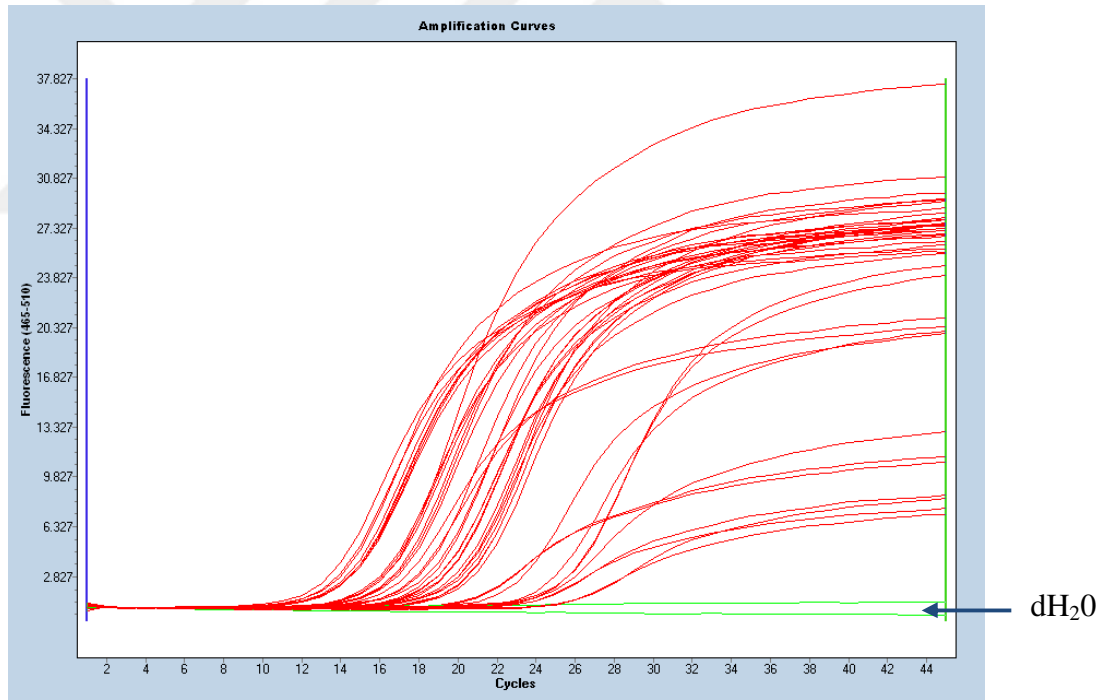
Kontrol grubunda cinsiyete göre yaş dağılımları Şekil 4.4.'de gösterildi.



Şekil 4.4. Kontrol grubunda cinsiyetler arası yaş dağılımının grafiği

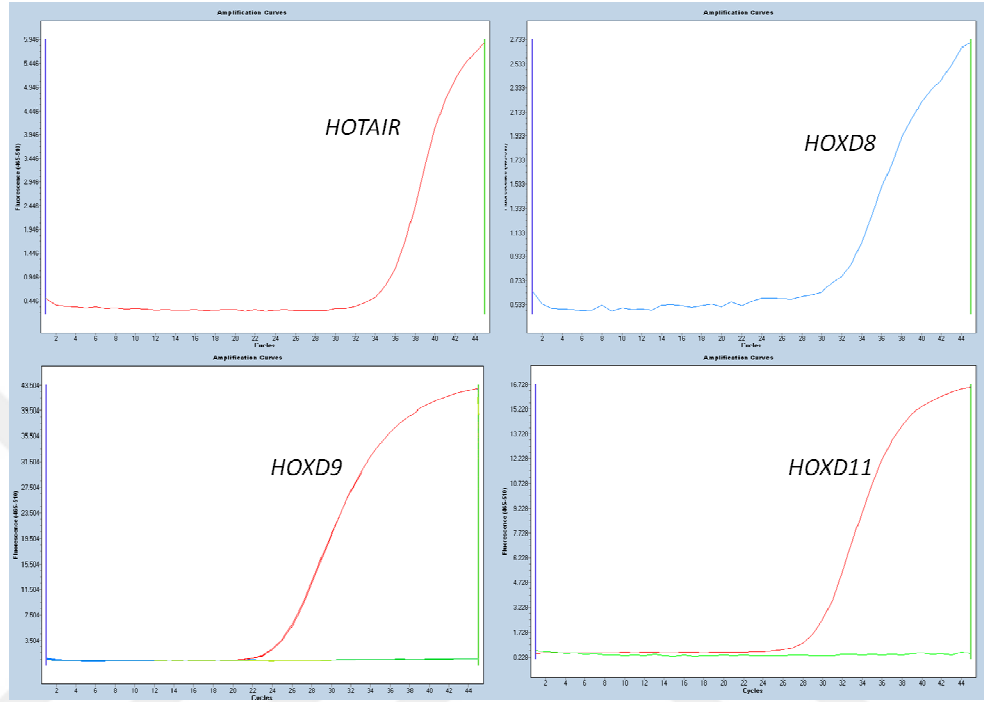
4.6. Kontrol Grubunda HOTAIR, HOXD8, HOXD9, HOXD11 Genlerinin Real Time PCR Analizi

Kontrol grubunda hedef genlerin ifade düzeyi Real Time PCR yöntemi ile incelendi. Çalışmamızda gen ifade analizinde normalizasyon işlemi için ve cDNA'nın kontrolünü yapabilmek için referans gen olarak *Beta-actin* referans geni kullanıldı. Her gene özgü primerler kullanılarak Light Cycler 480 II Real Time PCR cihazında gen ifade ölçümleri yapıldı. Relative (göreceli) kantitasyon için her örneğin hedef gendeki Cp değerleri, yine aynı örneklere ait *Beta-actin* referans geni Cp değerlerine oranlanarak normalize edildi. Kontrol grubu örneklerinde *Beta-actin* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.5.'de verildi. Örneklerin 12. ile 24. döngüler arasında en yüksek eğimi gösterdiği görüldü.



Şekil 4.5. Kontrol grubunda *Beta-actin* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

Örnek teşkil etmesi amacıyla K2 no'lu kontrol örneğinde *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerine ait Light Cycler 480 II Real Time PCR cihazında yapılan analizler sonucunda elde edilen Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.6.'da gösterildi.



Şekil 4.6. K2 no'lu kontrol örneğinin *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrilerinin görünümü

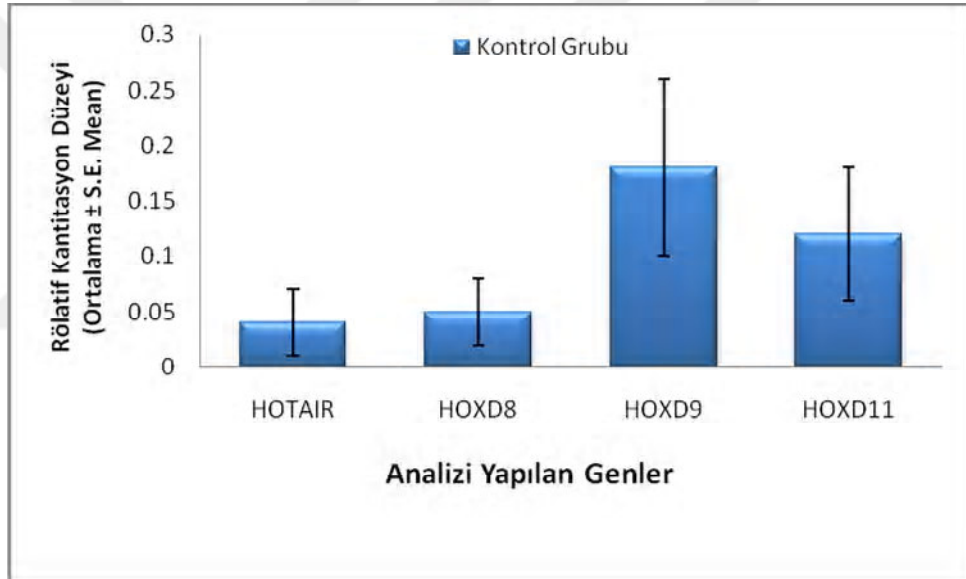
Kontrol grubunda normalize değerlerin her bir hedef gen için hesaplanan ortalama ve standart error mean (S.E.Mean) değerleri Tablo 4.8.'de verildi. *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinin kontrol grubundaki dağılımı Şekil 4.7.'de gösterildi.

Tablo 4.8. Kontrol Grubunda Genlerin İfade Düzeyleri

| GEN | Kontrol Grubu (N:20) |
|---------------|----------------------|
| HOTAIR | 0.04 ± 0.03 |
| HOXD8 | 0.05 ± 0.03 |
| HOXD9 | 0.18 ± 0.08 |
| HOXD11 | 0.12 ± 0.06 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.

N: Örnek Sayısı

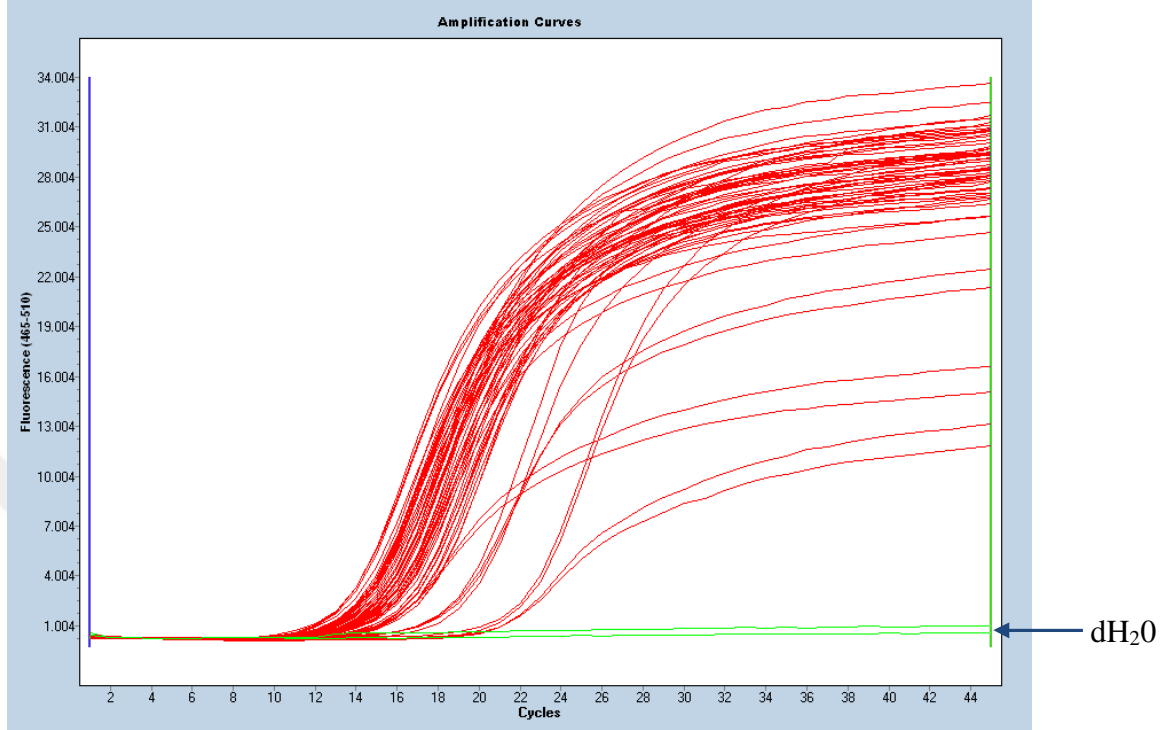


Şekil 4.7. Kontrol grubunda *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade seviyeleri ortalama değerleri grafiği

4.7. AML Hasta Grubunda *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* Genlerinin Real Time PCR Analizi

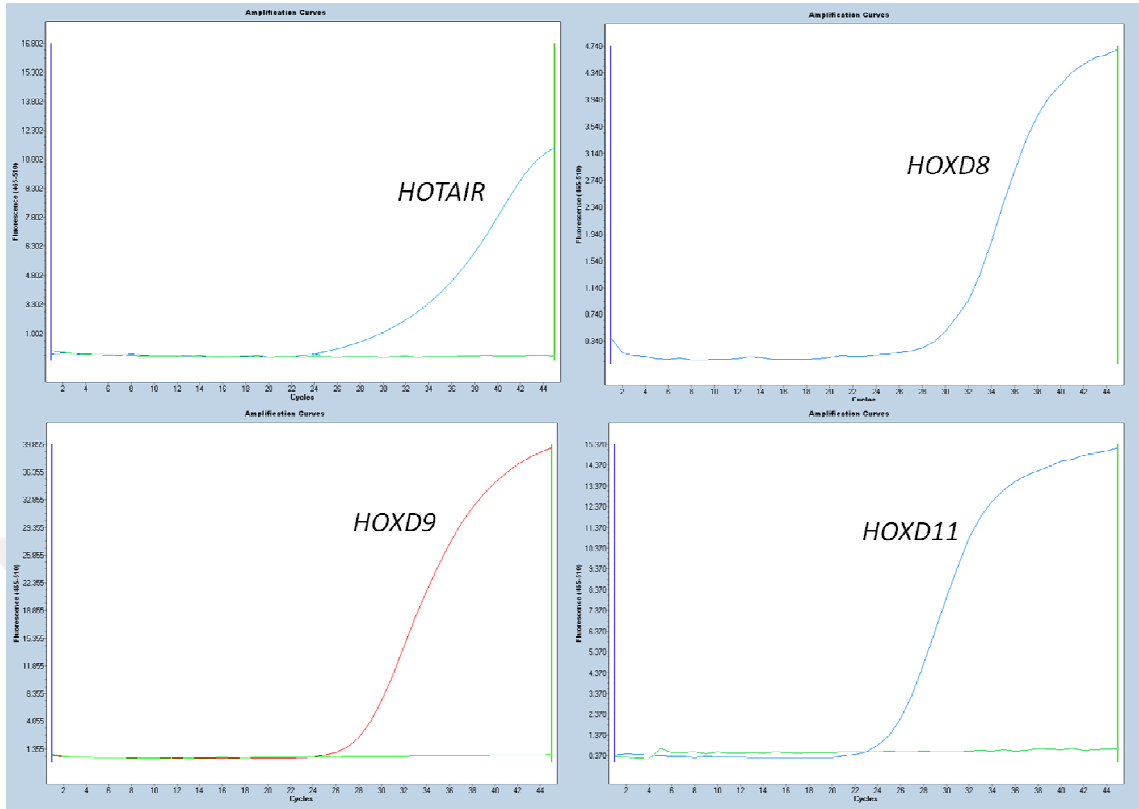
AML hasta grubunda hedef genlerin ifadesi Real Time PCR yöntemi ile ölçüldü. Normalizasyon için bütün örneklerde *Beta-actin* referans geni kullanıldı. Relative kantitasyon yapmak için her örneğin hedef gendeki Cp değerleri, yine aynı örneklere ait *Beta-actin* referans geni Cp değerlerine oranlanarak normalize edildi. AML hasta grubundaki örneklerin *Beta-actin* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

Şekil 4.8.'de verildi. Örneklerin 16. ile 26.döngüler arasında en yüksek eğimi gösterdiği görüldü.



Şekil 4.8. AML hasta grubunda *Beta-actin* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

Örnek teşkil etmesi amacıyla H1 no'lu AML hasta örneğinde *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerine ait Light Cyler 480 II Real Time PCR cihazında yapılan analizler sonucunda elde edilen Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.9.'da gösterildi.



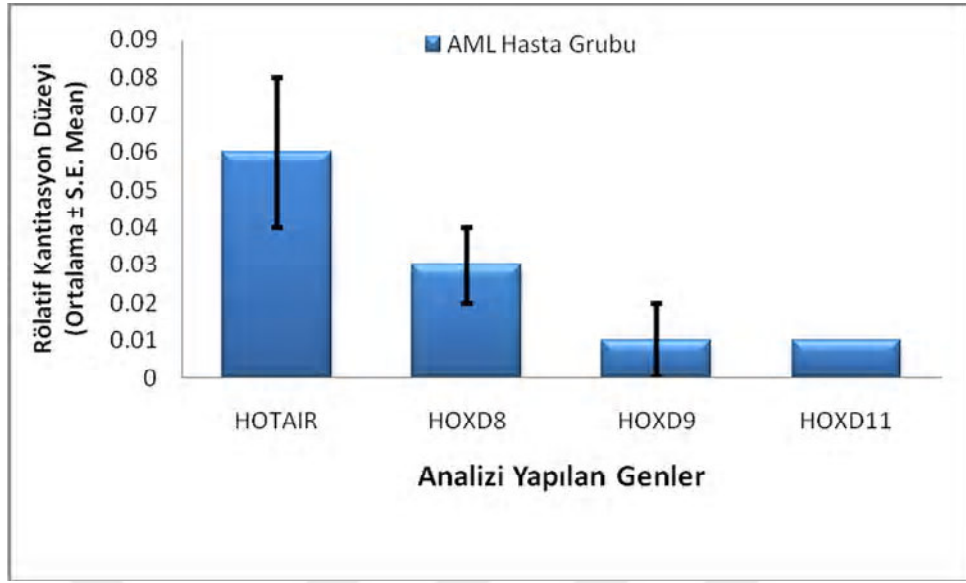
Şekil 4.9. H1 no'lu AML hasta örneğinin *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

AML hasta grubunda normalize değerlerin her bir hedef gen için hesaplanan ortalama ve standart error mean (S.E.Mean) değerleri Tablo 4.9.'da verildi. *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinin AML hasta grubundaki dağılımı Şekil 4.10.'da gösterildi.

Tablo 4.9. AML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeyleri

| GEN | AML Hasta Grubu (N:30) |
|---------------|------------------------|
| | |
| HOTAIR | 0.06 ± 0.02 |
| HOXD8 | 0.03 ± 0.01 |
| HOXD9 | 0.01 ± 0.01 |
| HOXD11 | 0.01 ± 0.00 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı



Şekil 4.10. AML hasta grubunda *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade seviyelerinin ortalama değerleri grafiği

4.8. AML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeylerinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

AML hasta grubunda çalışılan hedef genlerin ifade düzeyleri, kontrol grubu ile *T* testi yöntemine göre karşılaştırıldı. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi. AML hasta grubunda *HOTAIR* ve *HOXD8* genlerinin ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olup ($p > 0.05$), *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerindeki azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.10.).

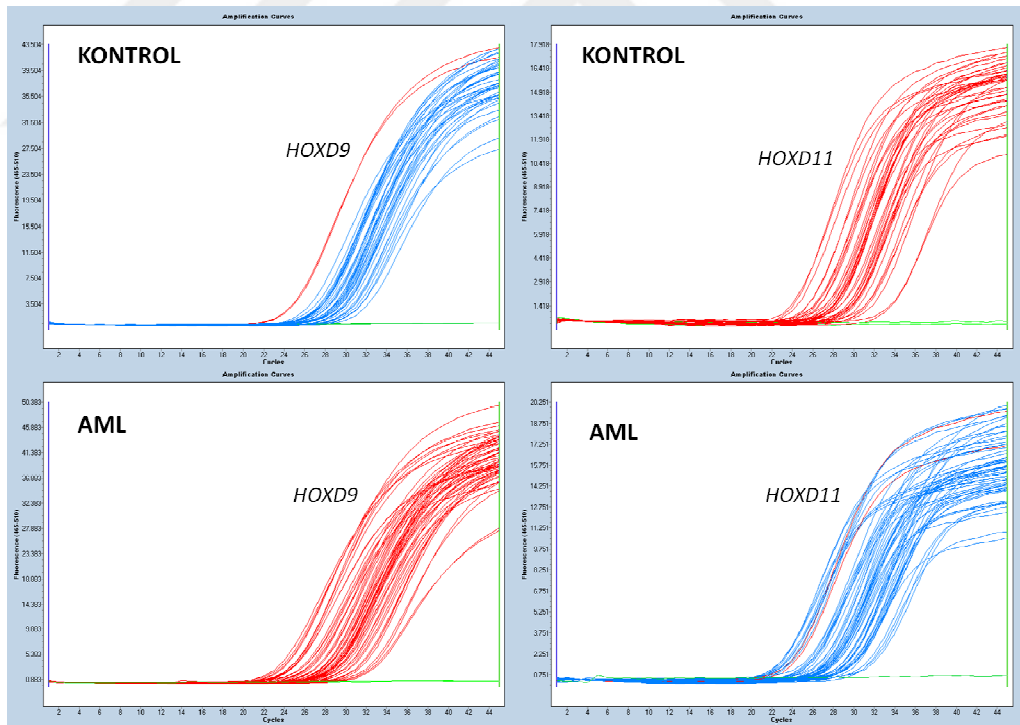
Tablo 4.10. Kontrol ve AML Hasta Gruplarında Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması

| GEN | Grup | | p |
|---------------|----------------|-------------|--------|
| | Kontrol (N:20) | AML (N:30) | |
| HOTAIR | 0.04 ± 0.03 | 0.06 ± 0.02 | 0.661 |
| HOXD8 | 0.05 ± 0.03 | 0.03 ± 0.01 | 0.242 |
| HOXD9 | 0.18 ± 0.08 | 0.01 ± 0.01 | <0.001 |
| HOXD11 | 0.12 ± 0.06 | 0.01 ± 0.00 | 0.002 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.

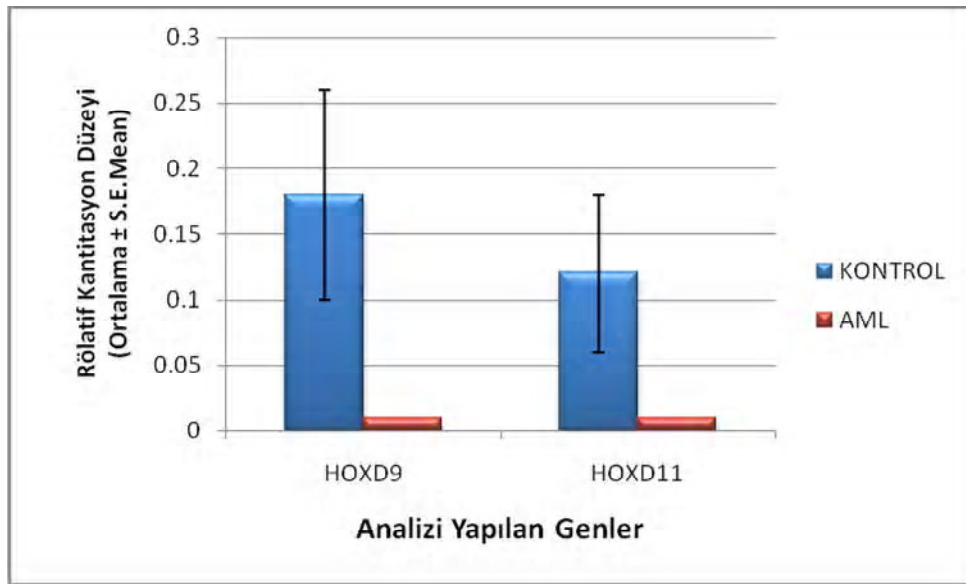
N: Örnek Sayısı

AML ve kontrol grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.11.'de gösterildi.



Şekil 4.11. AML ve kontrol grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

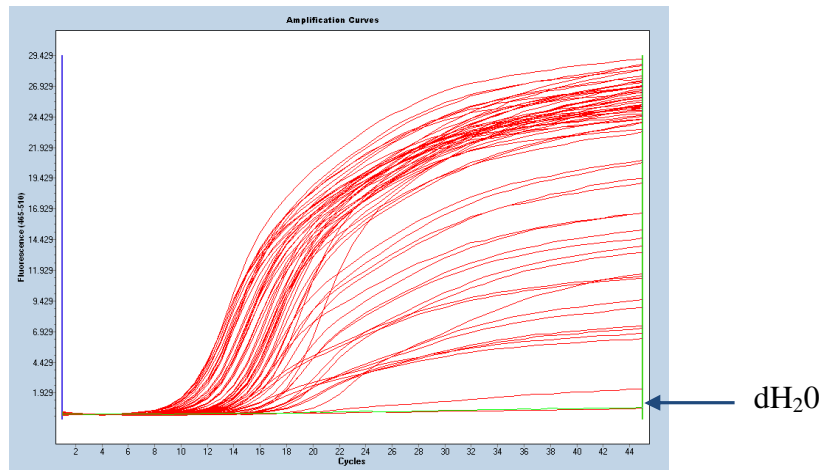
HOXD9 ve *HOXD11* gen ifade düzeylerinin AML ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırılması, Şekil 4.12.'de grafiksel olarak verildi.



Şekil 4.12. AML ve kontrol grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

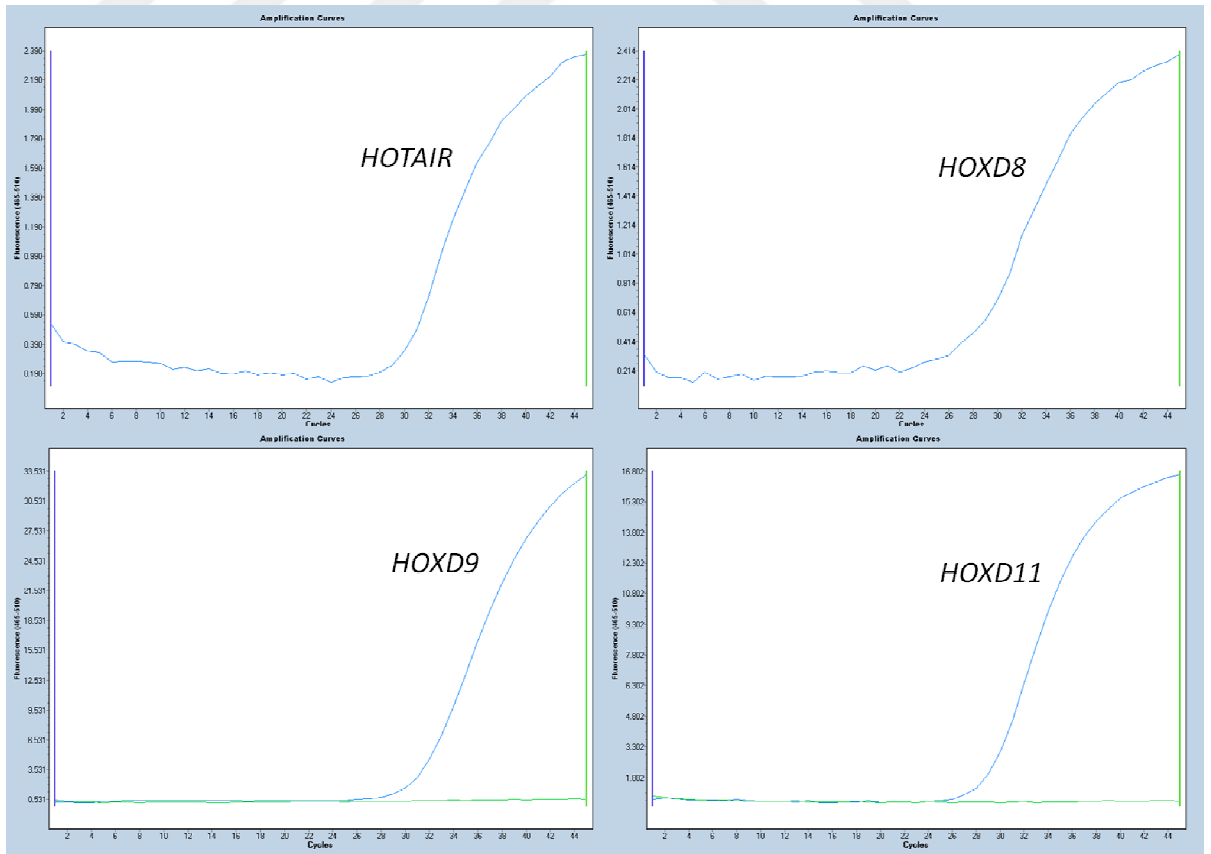
4.9. KML Hasta Grubunda *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* Genlerinin Real Time PCR Analizi

KML hasta grubunda hedef genlerin ifadesi Real Time PCR yöntemi ile ölçüldü. Her örneğin hedef gendeki Cp değerleri, aynı örneklere ait *Beta-actin* referans geni Cp değerlerine oranlanarak normalize edildi. Elde edilen değerler relatif kantitasyon değerleri olarak kullanıldı. KML hasta grubundaki örneklerin *Beta-actin* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrisi Şekil 4.13.'de verildi. Örnekler 12. ile 26. döngüler arasında en yüksek eğimi gösterdi.



Şekil 4.13. KML hasta grubunda *Beta-actin* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

Örnek teşkil etmesi amacıyla H34 no'lu KML hasta örneğinde *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerine ait Light Cycler 480 II Real Time PCR cihazında yapılan analizler sonucunda elde edilen Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.14.'de gösterildi.



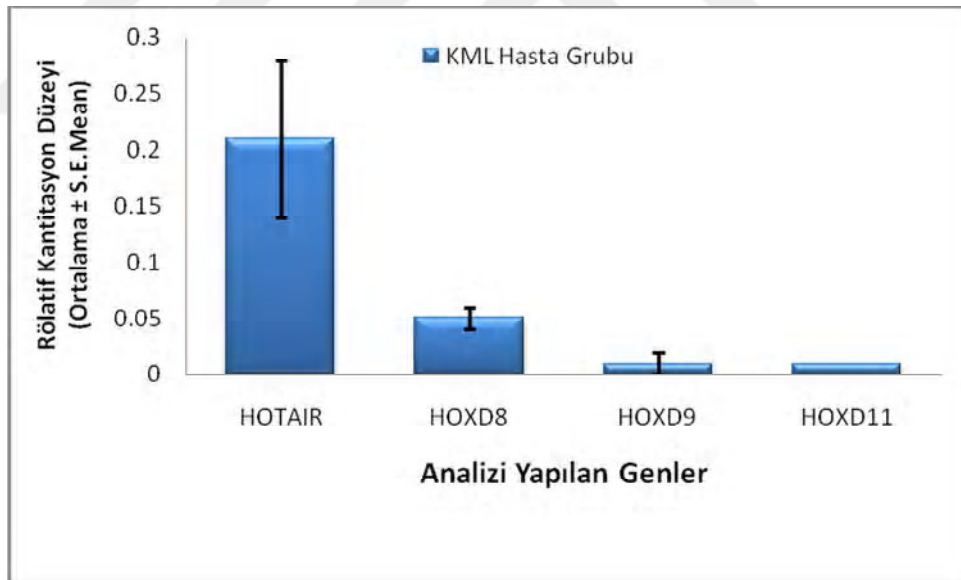
Şekil 4.14. H34 no'lu KML hasta örneğinin *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

KML hasta grubunda normalize değerlerin her bir hedef gen için hesaplanan ortalama ve standart error mean (S.E.Mean) değerleri Tablo 4.11.'de verildi. *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinin KML hasta grubundaki dağılımı Şekil 4.15.'de gösterildi.

Tablo 4.11. KML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeyleri

| GEN | KML Hasta Grubu (N:30) |
|---------------|------------------------|
| | |
| HOTAIR | 0.21 ± 0.07 |
| HOXD8 | 0.05 ± 0.01 |
| HOXD9 | 0.01 ± 0.01 |
| HOXD11 | 0.01 ± 0.00 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı



Şekil 4.15. KML hasta grubunda *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade seviyeleri ortalama değerleri grafiği

4.10. KML Hasta Grubunda Genlerin İfade Düzeylerinin Kontrol Grubu ile Karşılaştırılması

KML hasta grubunda çalışılan hedef genlerin ifade düzeyleri, kontrol grubu ile *T* testi yöntemine göre karşılaştırıldı. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

HOTAIR geninin ifade düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı derecede artmış olarak bulunmuş olup ($p < 0.05$), *HOXD8* geninin ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$).

HOXD9 ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı derecede azalmış olarak bulundu ($p < 0.05$) (Tablo 4.12.).

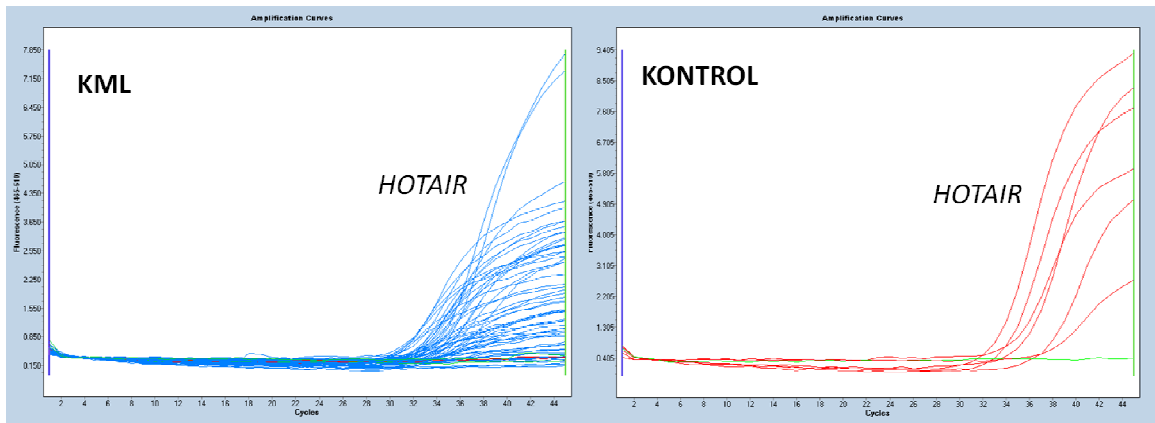
Tablo 4.12. Kontrol ve KML Hasta Gruplarında Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması

| GEN | Grup | | p |
|---------------|----------------|-------------|--------|
| | Kontrol (N:20) | KML (N:30) | |
| HOTAIR | 0.04 ± 0.03 | 0.21 ± 0.07 | 0.002 |
| HOXD8 | 0.05 ± 0.03 | 0.05 ± 0.01 | 0.463 |
| HOXD9 | 0.18 ± 0.08 | 0.01 ± 0.01 | <0.001 |
| HOXD11 | 0.12 ± 0.06 | 0.01 ± 0.00 | 0.001 |

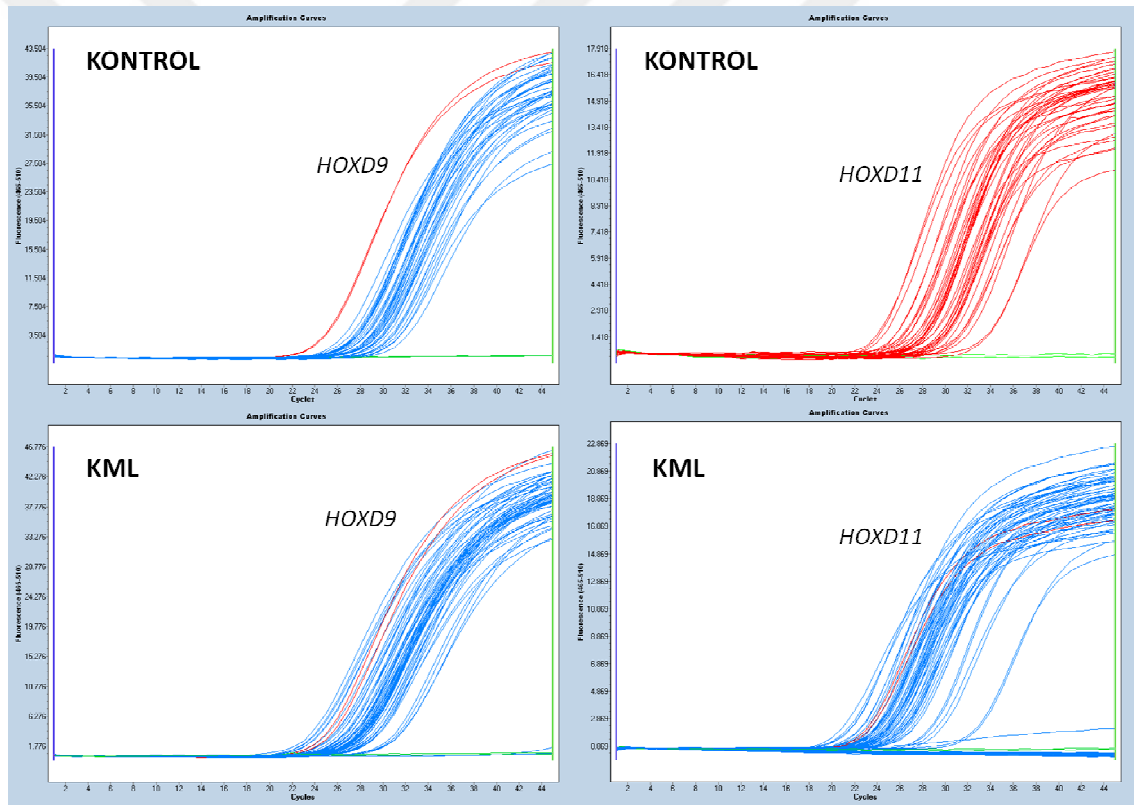
Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.

N: Örnek Sayısı

KML ve kontrol grubu örneklerinde *HOTAIR* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.16.'da, *HOXD9* ve *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.17.'de verildi. KML örnekleri 30. ile 38. döngüler arasında en yüksek eğimi gösterirken, kontrol örneklerinin 33. ile 38. döngüler arasında en yüksek eğimi gösterdiği görüldü

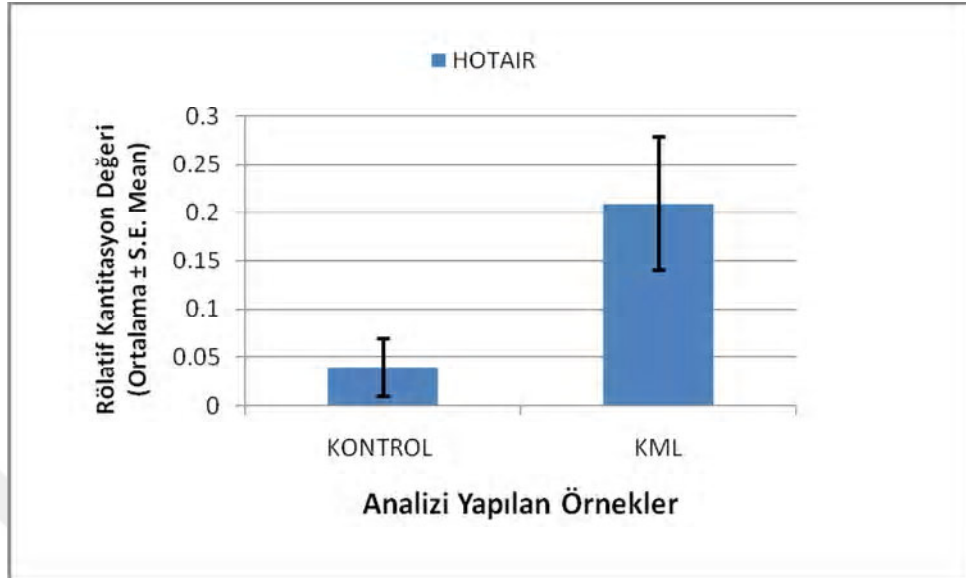


Şekil 4.16. KML ve kontrol grubunda *HOTAIR* genine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri



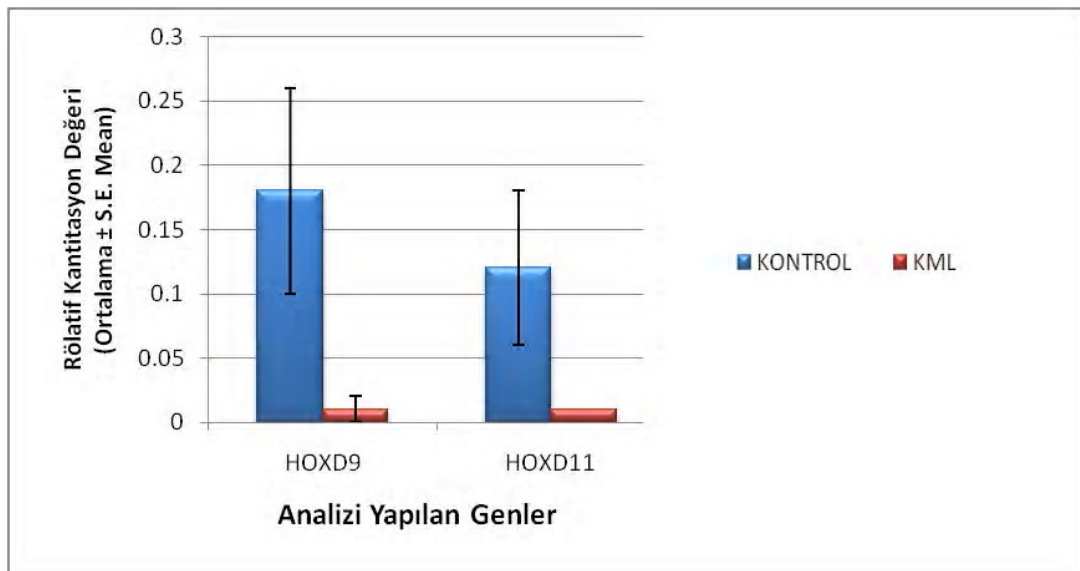
Şekil 4.17. KML ve kontrol grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* genlerine ait Real Time PCR amplifikasyon eğrileri

HOTAIR gen ifade düzeylerinin KML ve kontrol grubu arasında karşılaştırılması Şekil 4.18.'de grafiksel olarak verildi.



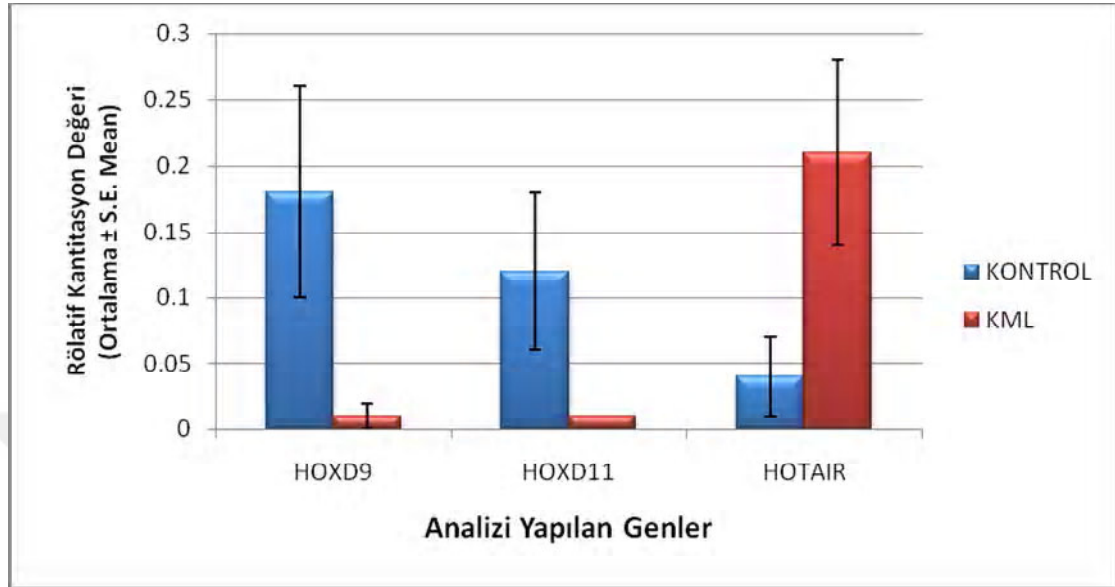
Şekil 4.18. KML ve kontrol grubunda *HOTAIR* gen ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

HOXD9 ve *HOXD11* gen ifade düzeylerinin KML ve kontrol grubu arasındaki karşılaştırılması Şekil 4.19.'da verildi.



Şekil 4.19. KML ve kontrol grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* gen ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

HOTAIR, *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinin birlikte karşılaştırıldığı grafik Şekil 4.20.'de verildi.



Şekil 4.20. KML ve kontrol grubunda *HOTAIR*, *HOXD9* ve *HOXD11* gen ifade seviyelerinin ortalama değerlerinin karşılaştırılması

4.11. AML ve KML Hasta Grupları Arasında Hedef Genlerin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

AML hasta grubunda çalışılan hedef genlerin ifade düzeyleri KML hasta grubu ile *T* testi yöntemine göre karşılaştırıldı. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

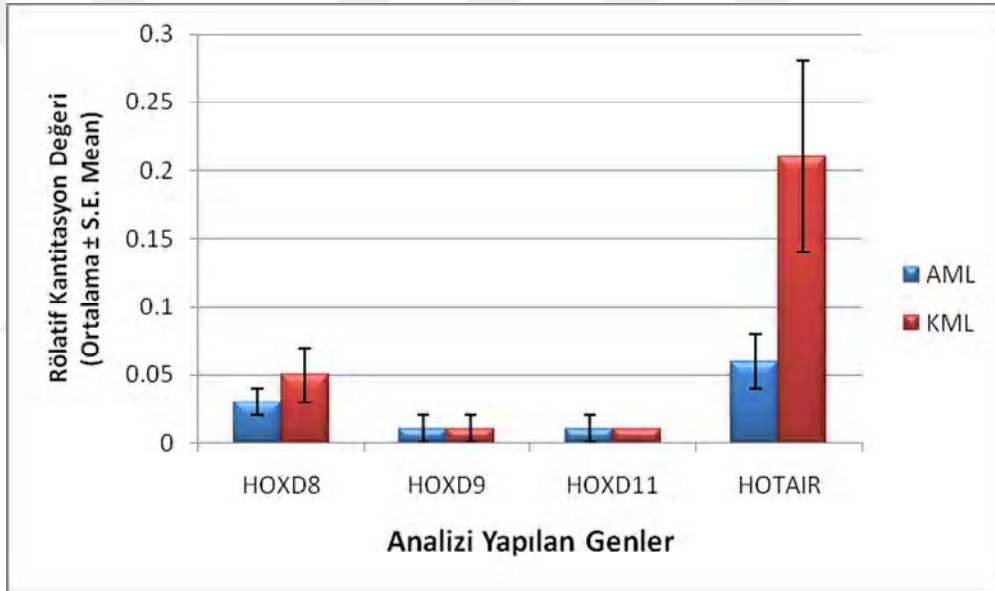
KML hasta grubunun *HOTAIR* gen ifadesi AML grubuna göre istatistiksel yönden değerlendirildiğinde daha yüksek bulunmuş olup ($p < 0.01$), *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinde, her iki hasta grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.13.), (Şekil 4.21.).

Tablo 4.13. AML ve KML Hasta Gruplarında Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması

| GEN | Grup | | p |
|---------------|-------------|-------------|-------|
| | AML (N:30) | KML (N:30) | |
| HOTAIR | 0.06 ± 0.02 | 0.21 ± 0.07 | <0.01 |
| HOXD8 | 0.03 ± 0.01 | 0.05 ± 0.02 | 0.396 |
| HOXD9 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.725 |
| HOXD11 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.00 | 0.940 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.

N: Örnek Sayısı



Şekil 4.21. AML ve KML hasta grupları arasında hedef genlerin ifade seviyelerinin ortalama değerleri

4.12. Kontrol ve Hasta Grupları Arasında Genlerin İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması

Hasta grubunda (AML-KML) çalışılan hedef genlerin ifade düzeyleri, kontrol grubu ile *T* testi yöntemine göre karşılaştırıldı. $p < 0.05$ düzeyi anlamlı kabul edildi.

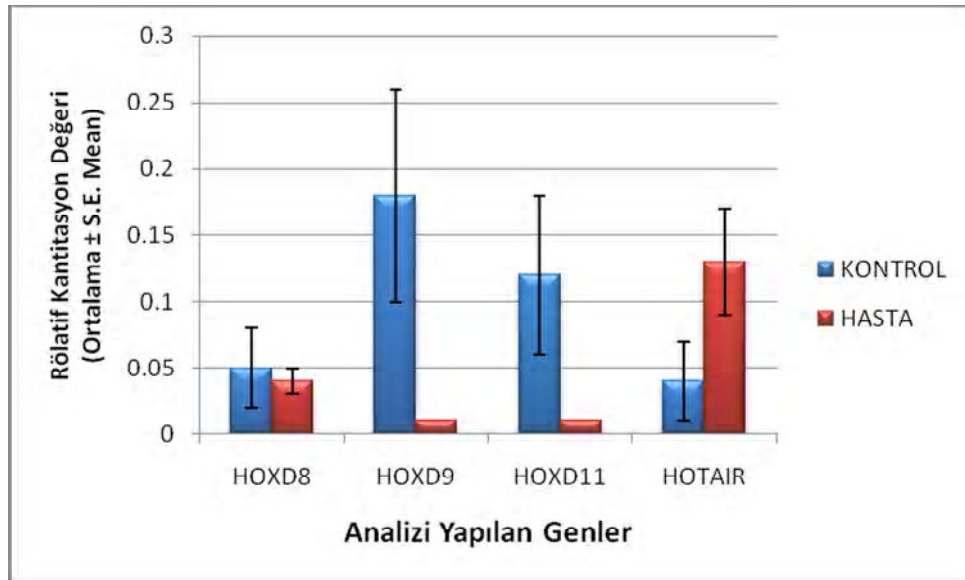
Hasta grubunda *HOTAIR* gen ifade düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ($p = 0.032$). Hasta grubunda *HOXD9* ve

HOXD11 genlerinin ifade düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı derecede düşük düzeyde bulundu ($p < 0.001$). *HOXD8* geninin ifade düzeyinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.14), (Şekil 4.22).

Tablo 4.14. Kontrol ve Hasta Gruplarında (AML-KML) Hedef Genlerin İfade Seviyeleri Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması

| GEN | Grup | | p |
|---------------|----------------|---------------------------|--------|
| | Kontrol (N:20) | Hasta (N:60) (KML-AML) | |
| HOTAIR | 0.04 ± 0.03 | 0.13 ± 0.04 | 0.032 |
| HOXD8 | 0.05 ± 0.03 | 0.04 ± 0.01 | 0.216 |
| HOXD9 | 0.18 ± 0.08 | 0.01 ± 0.00 | <0.001 |
| HOXD11 | 0.12 ± 0.06 | 0.01 ± 0.00 | <0.001 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı



Şekil 4.22. Kontrol ve hasta grupları (AML-KML) arasında hedef genlerin ifade seviyelerinin ortalama değerleri

4.13. Tüm Sonuçların Birlikte Değerlendirilmesi

HOTAIR gen ifadesinin en fazla olduğu grubun KML, daha sonra AML ve kontrol grubu olduğu gözlemlendi. AML ve kontrol grupları arasında *HOTAIR* gen ifade düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Fakat tüm hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, bu genin hasta grubunda daha fazla eksprese olduğu görüldü. *HOXD8* gen ifade düzeyinde tüm çalışma grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

HOXD9 gen ifadesi en fazla kontrol grubunda bulundu. AML ve KML grupları arasında bu genin ifade düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Ancak her iki hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında *HOXD9* gen ifade düzeyinin hasta gruplarında daha az olduğu görüldü.

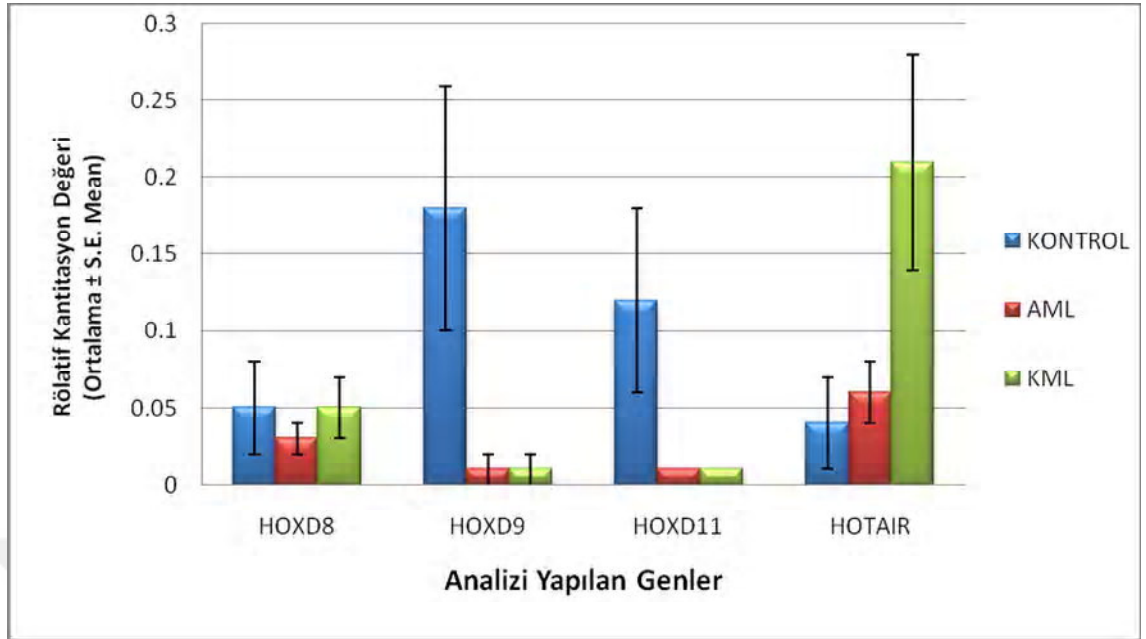
HOXD11 gen ifadesinin en fazla olduğu grubun kontrol grubu olduğu gözlemlendi. AML ve KML grupları arasında bu genin ifade düzeyinde anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Kontrol, AML ve KML hasta gruplarında çalışmaya alınan tüm hedef genlerin ifade düzeyleri Tablo 4.15 ve Şekil 4.23.'de görülmüştür.

Tablo 4.15. Kontrol Grubu, AML Grubu ve KML Hasta Grupları Arasında Hedef Genlerin İfade Seviyelerinin Birlikte Değerlendirilmesi

| Grup | Ölçülen Gen İfadeleri | | | |
|-------------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| | HOTAIR | HOXD8 | HOXD9 | HOXD11 |
| AML (N:30) | 0.06 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.00 |
| KML (N:30) | 0.21 ± 0.07 | 0.05 ± 0.02 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.00 |
| Kontrol (N:20) | 0.04 ± 0.03 | 0.05 ± 0.03 | 0.18 ± 0.08 | 0.12 ± 0.06 |

Veriler (Ortalama ± S.E.Mean) olarak ifade edilmiştir.
N: Örnek Sayısı



Şekil 4.23. Kontrol grubu, AML ve KML hasta gruplarında hedef genlerin ifade seviyelerinin ortalama değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik iliğinde myeloid seriyi meydana getiren hücrelerden olan granüositler ve monositler blast adı verilen genç hücrelerin karmaşık bir olgunlaşma süreci geçirmesiyle oluşurlar. AML blast hücrelerin olgunlaşamayıp kemik iliği ile kanda birikmesiyle karakterize malign bir hastalıktır (7).

Son 30 yılda, tedavideki gelişmelere rağmen erişkinlerde en sık görülen akut lösemi olan AML'deki remisyon oranı %50'nin altındadır (8). AML'nin biyolojisi ve AML hastalarının tedaviye verdikleri yanıt tek bir mutasyon tarafından değil, bir kombinasyon tarafından belirlenir. Bu durum AML'nin fenotipik olduğu kadar genotipik olarak da heterojenite gösteren kompleks bir hastalık olduğunun göstergesidir (121). Son yıllarda birtakım gen mutasyonları ve bunların yanı sıra kısıtlanmış gen ifadeleri, normal karyotipli AML hastalarında tanımlanmış olup söz konusu mutasyonların bazıları ayırıcı prognostik ve klinik özelliklerle ilişkilendirilmiştir. Bu durum normal karyotip içeren AML vakalarının büyük çoğunluğunda prognostik açıdan muazzam bir heterojeniteye işaret eder. Bu yüzden hastaların prognozlarının takibi, nüks öngörüsü ve uzun süreli takipleri için moleküler markırlara ihtiyaç vardır. Her yıl risk kategorilerini daraltacak yeni moleküler prognostik markırlar listelere eklenmektedir (122).

Garzon ve ark. 2014 yılında yapmış oldukları bir çalışmada; lncRNA'ların sitogenetik olarak normal (CN) 60 yaş ve üzeri AML hastalarında klinik özellikler ve tekrarlayan mutasyonlarla ilişkili olup olmadığını belirlemek için, tedavi almamış 148 CN-AML olgusunda spesifik bir microarray platformu kullanarak lncRNA ifadesini değerlendirmişlerdir. Belirgin lncRNA profillerinin, *FLT3* genindeki (FLT3-ITD) iç tandem duplikasyonları ve *NPM1*, *CEBPA*, *IDH2*, *ASXL1* ve *RUNX1* genlerindeki mutasyonlar gibi seçilmiş mutasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. lncRNA'ların ifade profillerinin AML'de tekrarlayan mutasyonlar, klinik özellikler ve sonuçlarla ilişkili olduğunu, bu lncRNA'ların bir kısmının lösemogenezde fonksiyonel bir role sahip olabileceğini, ayrıca AML'de biyomarkır olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

lncRNA ifadesine dayanarak, tek başına standart tedavi ile tam remisyona ulaşma olasılığı olan hastaların belirlenmesi, bu tür hastaları potansiyel olarak diğer toksisitelerden uzaklaştırmak ve post remisyon çalışmaları üzerine araştırma yaklaşımlarına odaklanmak gibi önemli bir ilerleme olduğunu vurgulamışlardır (101).

Bizim araştırmamızda; yeni tanı alan 30 AML hastasında Real Time PCR yöntemi kullanılarak *HOTAIR*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD11* gen ifade düzeyleri ölçülerek *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerindeki azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuş olup; *HOTAIR* ve *HOXD8* genlerinin ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

HOTAIR, çeşitli insan solid tümörlerinde artmış ifadesi ile karakterize, potansiyel bir kanser biyomarkırı olarak düşünülen uzun kodlamayan bir RNA'dır. Son zamanlarda birçok kanser çeşidinde yapılan çalışmalarda *HOTAIR*'ın yüksek düzeyde ifadelerine rastlanılmaktadır. *HOTAIR*, solid tümörlerde epigenetik gen regülasyonu, metastaz ve prognoza katkıda bulunurken, hematolojik hastalıklardaki rolleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca, literatür incelendiğinde akut ve kronik myeloid lösemili hastalarda *HOXD* genlerinin mRNA ifade düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır (4).

Wu ve ark. AML hastalarında *HOTAIR* ifade profilini araştırmak ve tümör progresyonunda klinik önemi değerlendirmek amacıyla, yeni tanı alan 85 AML hastasının kemik iliği veya periferik kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücrelerde *HOTAIR* ifadesini incelemek için kantitatif polimeraz zincir reaksiyon (qPCR) yöntemini kullanmışlardır. *HOTAIR* ifadesinin AML hastalarında klinikopatolojik faktörleri ve prognozu ile ilişkisini istatistiksel olarak analiz etmişlerdir. AML hastaları, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, *HOTAIR* ifadesinin belirgin şekilde artmış olduğu görülmüş ve tedavi sonrasında *HOTAIR* ifade düzeyinin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Yüksek düzeyde *HOTAIR* ifadesi bulunan hastaların, düşük düzeyde *HOTAIR* ifadesi olan hastalara kıyasla, genel sağkalım ve relaps görülmeyen sağkalım süreleri açısından nispeten zayıf olduğu belirtilmiştir. *HOTAIR*'ın, kötü prognozun bir biyomarkırı olarak temsil edilebileceği ve AML tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği öngörülmüştür (123). Hao ve ark. *de novo* AML hastalarının, AML tam remisyon (AML-CR) hastalarının ve sağlıklı kontrollerin kemik iliği örneklerinde *HOTAIR* ifadesini gerçek zamanlı kantitatif reverse transkripsiyon PCR (qRT-PCR) yöntemiyle değerlendirmişlerdir. *de novo* AML

hastaları; AML-CR hastaları ve normal kontroller ile karşılaştırıldığında; *HOTAIR* ifadesinin belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir. *HOTAIR* aşırı ifadesinin klinik önemini incelemek için *de novo* AML örneklerinin klinikopatolojik parametreleri ile *HOTAIR* ifade düzeyi arasındaki korelasyon araştırılmıştır. Analizler, yükselmiş *HOTAIR* seviyesinin hastalığın yüksek risk grubu ile anlamlı korelasyon gösterdiğini; bununla birlikte, hastaların cinsiyeti veya lösemi alt tipi arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını göstermiştir. *HOTAIR*'ın AML'deki rolünü daha detaylı incelemek için, lösemi hücresi proliferasyonu üzerine fonksiyonel etkilerini de araştırmışlardır. *HOTAIR*'ın baskılandığı lösemi hücrelerinde hücre proliferasyonunun önemli derecede azaldığını göstermişlerdir. *HOTAIR*'ın baskılanmasıyla *in vitro* olarak lösemi hücresi proliferasyonunun inhibe edilebilmesinin, AML için yeni bir prognoz markırı ve tedavi için umut verici bir hedef olabileceği vurgulanmıştır (124). Zhang ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada, *HOTAIR*'ın akut lösemilerdeki rolünü araştırmışlardır. 96 akut lösemi hastasının ve 80 sağlıklı kontrolün mononükleer hücrelerinde *HOTAIR* ve *HOTAIR* sinyal yolunda görev alan her bir genin ifadesini Real Time PCR yöntemi kullanarak analiz etmişlerdir. Akut monositik lösemi (M5) hastalarında *HOTAIR* ifadesinin kontrol örneklerine göre artmış olduğunu ve diğer AML tiplerine göre artışın daha yüksek olduğunu, M5 hastalarında *HOTAIR*'ın kötü prognozla yakından ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. *HOTAIR* ifadesini, ALL, AML, M5 olmayan AML hastaları ile karşılaştırmışlar ve istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir (125). Xing ve ark. *HOTAIR* lncRNA'nın artmış ifadesinin, *HOTAIR* ve miR-193a arasındaki etkileşim yoluyla c-KIT proto-onkogeninin ifadesini modüle ederek AML'de onkojenik bir aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir (126). Lin ve ark. yaptıkları meta analizlerde, *HOTAIR*'ın lösemi ve lenfomadaki kötü prognozu değerlendirmek için yeni bir belirleyici faktör olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak, büyük sayıları kapsayan lösemi ve lenfoma hasta gruplarında prognostik rolü araştıran prospektif randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğunu da ifade etmişlerdir (127). Sayad ve ark. İran toplumunda yapmış oldukları bir çalışmada *HOTAIR*'ın AML hastaları için bir biyomarkır olmadığını ifade etmişlerdir. 25 *de novo* AML hastası ve 40 sağlıklı kontrolün periferik kan örneklerini kullanarak *HOTAIR* ifadesini qRT-PCR yöntemi ile değerlendirmişlerdir. AML hastaları ve sağlıklı kontroller arasında *HOTAIR* gen ifade düzeyinde anlamlı bir fark olmadığını belirtmişlerdir. *HOTAIR*'ın ifade düzeyi ve AML'ye duyarlılığı arasında olası bir ilişkiyi araştırmak adına erkekler ve kadınlar

arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını da bildirmişlerdir. Araştırmacılar; *HOTAIR* ifade düzeyinin, AML için kesin bir tanısal veya terapötik biyomarkır olarak düşünülmemeyeceğini, elde ettikleri sonuçların ileride yapılacak olan çalışmalarla doğrulanması gerektiğini ve *HOTAIR* ile AML arasındaki korelasyonun hâlen araştırılması gerektiğini vurgulamışlardır (128).

Bizim araştırmamızda; yeni tanı alan 30 AML hastasının ve kontrol grubu olarak da 20 sağlıklı bireyin periferik kan örnekleri kullanıldı. Elde ettiğimiz bulgulara göre; AML hastalarında *HOTAIR* geninin ifade düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). AML hasta grubu ile yaptığımız analizler, Sayad ve ark. yapmış oldukları çalışmaya benzer nitelikte *HOTAIR* ifade seviyesinin, AML için kesin bir tanısal veya terapötik biyomarkır olarak düşünülmemeyeceğini desteklemektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, AML hastalarındaki *HOTAIR* ifade düzeyinin prognostik rolünün araştırıldığı daha fazla hasta sayısı içeren ve daha kapsamlı çalışmalara hâlen ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Blastik hücre popülasyonunun kemik iliğinde daha belirgin olarak lokalize oldukları göz önüne alındığında, *HOTAIR* geninin ifade düzeyinin kemik iliği örneklerinde de ölçülmesi, çalışmamızın daha etkin çıktılar verebilmesine imkân sağlayabilir.

KML, erişkinlerde yeni tanı alan lösemının yaklaşık %15'ini oluşturan majör myeloproliferatif bir hastalıktır. 22. kromozom üzerinde bir hibrid BCR-ABL onkogeni oluşur ve bu genin ürünü olan p210 peptidi KML'nin patogenezinde rol oynayan yapısal olarak aktifleştirilmiş tirozin kinaz aktivitesine sahiptir (104). KML için yaygın olarak kullanılan ve oldukça etkili olan tedavi, BCR-ABL onkoproteininin kinaz aktivitesini inhibe eden tirozin kinaz inhibitörlerinden imatinib mesilat uygulamasıdır. BCR-ABL'yi hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri çoğu KML hastası için ilk basamak tedavidir ve KML prognozunu büyük ölçüde geliştirmiştir. Bununla birlikte, imatinib direnci, KML tedavisinde büyük bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Tirozin kinaz inhibitör tedavisine karşı dirençle birkaç moleküler yol ilişkilendirilmiştir ancak ilaç direncinin gelişmesinin kesin mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle son yıllarda, tanıda klinik sonuçları öngörebilen, hastaların prognostik olarak sınıflandırılmasına yardımcı olan ve ilaç direncini öngörmek ve yönetmek için lncRNA'ların ifade profilleri üzerinde durulmaya başlanmıştır (129). Yeni potansiyel biyolojik markırların tanımlanması; hastaya uygun tedavi sürecinin uygulanması ve gelişebilecek ilaç

direncinin pratik olarak izlenebilmesine olanak sağlayarak hastalarda uzun vadeli daha iyi sonuçların alınması için önemlidir (103).

Bu durumda lncRNA'lar prognostik faktör olarak büyük önem kazanmaktadır. Birçok kanser çeşidinde biyomarkır olarak kullanılabilmeleri için çalışmalar sürdürülmektedir. lncRNA'lar epigenetik gen regülasyonuna, metastazlara ve solid tümörlerin prognozuna katkıda bulunurken, hematopoetik kanserlerle olan ilişkisi de son yıllarda yapılan çalışmalar ile ortaya konmaya başlanmıştır (130).

Wang ve ark. yapmış oldukları çalışmada imatinibe karşı KML direncinde *HOTAIR*'ın mekanizmalarını araştırmışlardır. KML hastalarında *HOTAIR* ifadesini tespit etmek için Real Time PCR yöntemini kullanmışlardır. 34 KML hastasını *MRP1*-düşük ve *MRP1*-yüksek olmak üzere gruplara ayırmışlardır. *HOTAIR*'ın ifadesinin *MRP1* yüksek olan hastalarda ve K562-imatinibe dirençli hücrelerde kontrol ile karşılaştırıldığında büyük ölçüde arttığını göstermişlerdir. K562-imatinibe dirençli hücrelerde *HOTAIR* ifadesinin baskılanmasıyla *MRP1* geninin ifadesinin azaldığını ve imatinib tedavisine daha yüksek hassasiyet geliştiğini göstermişlerdir. Ayrıca, K562-imatinibe dirençli hücrelerde *HOTAIR* ifadesinin baskılanmasının PI3K/Akt aktivasyonunu büyük ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. *HOTAIR*'ın KML hücrelerinde çoklu ilaç direncini PI3K/Akt sinyal yolunun aktivasyonu ile modüle ettiğini belirtmişlerdir (131). Wang ve ark. imatinibe dirençli olduğu bilinen KML hücrelerinde *HOTAIR*'ın ifadesinin artmış olduğunu bildirmişlerdir (131).

Bizim araştırmamızda ise yeni tanı alan tedavi öncesi KML hastalarında *HOTAIR* geninin ifade düzeyinin kontrol grubuna göre artmış olduğu görüldü ($p < 0.05$). KML grubunun *HOTAIR* gen ifadesi AML grubuna göre daha yüksek düzeyde bulundu ($p < 0.05$). Hasta grubunda (AML-KML) *HOTAIR* gen ifade düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel yönden anlamlı derecede yüksek olarak bulundu ($p = 0.032$). Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda *HOTAIR* ifadesindeki artışın yeni tanı alan KML hastalarında önemli bir potansiyel faktör olabileceği söylenebilir.

HOX genleri embriyo hücrelerinde vücutta hangi yapıların nerede bulunacaklarını ve bu nedenle neye dönüşeceklerini belirleyen genlerdir. Tüm homeotik genler *HOX* denilen 180 nükleotidlik (60 aa) ortak nokta içermektedir. *HOX* genleri kendi içinde A, B, C, D olmak üzere 4 gruba ayrılmakta ve farklı kromozomlarda lokalize olmaktadır (63). *HOTAIR*, 2. kromozomun *HOXD* lokusunda yer alan *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD11* genlerinin ifadesini baskılamaktadır (8,45).

AML hastalarında yapılan çalışmalarda *HOXD* genlerinin ölçülebilecek ifadelerine rastlanmamıştır (132). *HOXD11* geninin hematolojik hastalıklarla olan ilişkisi tam olarak bilinmemektedir (86).

Bizim araştırmamızda, *HOTAIR* ile lösemi arasındaki ilişkiyi ve *HOTAIR*'ın prognostik rolü hakkındaki önemini kavramak için daha fazla veri elde etmek amacıyla *HOTAIR* ile birlikte aynı zamanda *HOTAIR* tarafından hedef alınarak baskılanan *HOXD* genlerinden *HOXD8*, *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin de ifade düzeyleri, hem sağlıklı kontrollerde hem de AML ve KML hasta grubunda ölçülerek karşılaştırıldı. AML hasta grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeyi kontrol grubuna göre düşük düzeyde bulundu ($p < 0.05$). Yeni tanı almış 30 AML hastasında *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifadelerinin baskılandığı gösterildi. KML hasta grubunda *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre azalmış olduğu görüldü ($p < 0.05$). KML tanısını yeni alan 30 hastanın tedavi öncesi kan örnekleriyle yaptığımız çalışmada *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifadelerinin baskılandığı gösterildi. AML ve KML grupları arasında *HOXD8*, *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifade düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$).

Sonuç olarak; *HOTAIR* geninin, KML hastalarında *HOXD9* ve *HOXD11* genlerinin ifadesini baskılayarak onkojenik faaliyet gösterdiği, *HOTAIR*'ın ifade profillerinin KML hastalarının prognostik olarak sınıflandırılmasında ve ilaç direncinin öngörülmesi ve izlenmesinde potansiyel bir biyomarkır olabileceği, daha fazla hasta sayısı içeren protein düzeyindeki çalışmalarla da desteklenerek söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309: 1559–1563.
2. Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; 447: 799–816.
3. Kapranov P. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 2007; 316: 1484–1488.
4. Wu ZH, Wang XL, Tang HM, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer. *Oncol Rep* 2014; 32: 395–402.
5. Chiyoumaru T, Yamamura S, Fukuhara S, et al. Genistein inhibits prostate cancer cell growth by targeting miR-34a and oncogenic HOTAIR. *PLoS One* 2013; 8(8): e70372.
6. Liu XH, Sun M, Nie FQ, et al. Lnc RNA HOTAIR functions as a competing endogenous RNA to regulate HER2 expression by sponging miR-331-3p in gastric cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 92.
7. Pekçelen Y, Dinçol G, Atamer T, et al. *Klinik Hematoloji* (1. Baskı), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003: s414.
8. Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129(7): 1311–1323.
9. Campbell NA, Reece JB. Genden Proteine, In: *Biyoloji* (6. Baskı), Gündüz E, Demirsoy A, Türkan İ, (Eds), Palme Yayıncılık, Ankara, 2008: p309-313.

10. Varani G, McClain WH. The G·U wobble base pair: a fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *EMBO reports* 2000; 1(1): 18-23.
11. Carninci P, Yasuda J, Hayashizaki Y. Multifaceted mammalian transcriptome. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 274-280
12. Mattick JS. A new paradigm for developmental biology. *J Exp Biol* 2007; 210: 1526–1547.
13. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
14. Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, et al. Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *Embo J* 2000; 19: 5194–5201.
15. Kanduri C, Whitehead J, Mohammad F. The long and the short of it: RNA-directed chromatin asymmetry in mammalian X-chromosome inactivation. *FEBS Letter* 2009; 583: 857–864.
16. Gündoğdu R, Çelik V. RNA İnterferans (RNAi). *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2009; 25(1-2): 34-47.
17. Unver T, Budak H. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta* 2009; 230: 659-669.
18. Fire A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391:806–811.
19. Zhang S, Chen S, Yang G, et al. Long noncoding RNA HOTAIR as an independent prognostic marker in cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e105538.
20. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2007; 131: 11-29.
21. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269.

22. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-640.
23. Bernstein E, Allis CD. RNA meets chromatin. *Genes Dev* 2005; 19: 1635-1655.
24. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* 2010; 12: 1-27.
25. Calin G, Dumitru C D, Shimizu M, et al. Frequent deletions and downregulation of micro RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99(24): 15524–15529.
26. Martens-Uzunova ES, Böttcher R, Croce CM, et al. Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *European Urology* 2014; 65(6): 1140-1151.
27. Kong W, Zhao JJ, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J Cell Physiol* 2009; 218: 22-25.
28. Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B. Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature* 2010; 466: 637–641.
29. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009; 136: 629–641.
30. Guttman M, Amit I, Garber M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458: 223-227.
31. Malek E, Jagannathan S, Driscoll JJ. Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer. *Oncotarget* 2014; 5: 8027–8038.
32. Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, et al. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet Nat Publish Group* 2015; 47: 199–208.
33. Ariel I, de Groot N, Hochberg A. Imprinted H19 gene expression in embryogenesis and human cancer: the oncofetal connection. *Am J Med Genet* 2000; 91: 46–50.

34. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL, et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* 1991; 349: 38–44.
35. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–854.
36. Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 2001; 294: 797-799.
37. Wei S, Du M, Jiang Z, et al. Long noncoding RNAs in regulating adipogenesis: new RNAs shed lights on obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2016; 73(10): 2079-2087.
38. Martens-Uzunova ES, Böttcher R, Croce C, et al. Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *European Urology* 2014; 65: 1140-1151.
39. Han D, Wang M, Ma N, et al. Long noncoding RNAs: novel players in colorectal cancer. *Cancer Lett* 2015; 361(1) :13-21.
40. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 11667-11672.
41. Bhan A, Mandal SS. LncRNA HOTAIR: A master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Reviews on Cancer* 2015; 1856(1): 151-164.
42. Aguilo F, Zhou MM, Walsh MJ. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer Res* 2011; 71: 5365-5369.
43. van der Stoop P, Boutsma EA, Hulsman D, et al. Ubiquitin E3 ligase Ring1b/Rnf2 of polycomb repressive complex 1 contributes to stable maintenance of mouse embryonic stem cells. *PLoS One* 2008; 3: e2235.
44. Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 846-856.
45. Tsai MC, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 2010; 329: 689-693.
46. Zhang H, Cai K, Wang J, et al. MiR-7, inhibited indirectly by LincRNA HOTAIR, directly inhibits SETDB1 and reverses the EMT of breast cancer stem cells by downregulating the STAT3 pathway. *Stem Cells* 2014; 32: 2858–2868.

47. Zhou X, Chen J, Tang W. The molecular mechanism of HOTAIR in tumorigenesis, metastasis, and drug resistance. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2014; 46: 1011-1015.
48. Ma MZ, Li CX, Zhang Y, et al. Long non-coding RNA HOTAIR, a c-Myc activated driver of malignancy, negatively regulates miRNA-130a in gallbladder cancer. *Mol Cancer* 2014; 13: 156.
49. Liu X, Liu ZL, Sun M, et al. The long non-coding RNA hotair indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2013; 13: 464.
50. Zhuang Y, Wang X, Nguyen HT, et al. Induction of long intergenic non-coding RNA HOTAIR in lung cancer cells by type I collagen. *J Hematol Oncol* 2013; 6: 35.
51. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, et al. Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 141: 160–170.
52. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, et al. Antisense transcript long noncoding RNA (lncRNA) HOTAIR is transcriptionally induced by estradiol. *J Mol Biol* 2013; 425: 3707–3722.
53. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA hotair regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res* 2011; 71: 6320–6326.
54. Nie Y, Liu X, Qu S, et al. Long non-coding rna hotair is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival. *Cancer Sci* 2013; 104: 458–464.
55. Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, et al. Clinical significance of the expression of long non-coding rna hotair in primary hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2013; 29: 946–950.
56. Wu Y, Liu J, Zheng Y, et al. Suppressed expression of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and tumourigenicity of renal carcinoma cells. *Tumour Biol* 2014; 35(12): 11887-11894.

57. Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M, Zeinoddini M. Up-regulation of HOTAIR long non-coding RNA in human gastric adenocarcinoma tissues. *Med Oncol* 2013; 30: 670.
58. Yao Y, Li J, Wang L. Large intervening non-coding RNA HOTAIR is an indicator of poor prognosis and a therapeutic target in human cancers. *International Journal of Molecular Sciences* 2014; 15(10):18985-18999.
59. Li D, Feng J, Wu T, et al. Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2013; 182(1): 64–70.
60. Cong N, Du P, Zhang A, et al. Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the wnt/beta-catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2013; 29(4): 1579–1587.
61. Liu J, Ruan B, You N, et al. Downregulation of miR-200a induces EMT phenotypes and CSC-like signatures through targeting the beta-catenin pathway in hepatic oval cells. *Plos One* 2013; 8(11): e79409.
62. Huang J, Ke P, Guo L, et al. Lentivirus mediated RNA interference targeting the long noncoding RNA HOTAIR inhibits proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer* 2014; 24: 635–642.
63. Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 361-371.
64. Lewis EB. Clusters of master control genes regulate the development of higher organisms. *JAMA* 1992; 267(11): 1524–1531.
65. Ruddle FH, Bartels JL, Bentley KL, et al. Evolution of Hox genes. *Annu Rev Genet* 1994; 28: 423-442.
66. Pineault KM, Swinehart IT, Garthus KN, et al. *Hox11* genes regulate postnatal longitudinal bone growth and growth plate proliferation. *Biol Open* 2015; 4(11): 1538–1548.
67. Cillo C, Barba P, Fresch, G, et al. HOX gene expression in normal and neoplastic human kidney. *International Journal of Cancer* 1992; 51(6): 892-897.

68. Rossi Degl'Innocenti D, Castiglione F, Buccoliero AM, et al. Quantitative expression of the homeobox and integrin genes in human gastric carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine* 2007; 20(4): 621-629.
69. Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, et al. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11) (p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet* 1996; 12(2): 154–158.
70. Bhatlekar S, Fields JZ, Boman BM. HOX genes and their role in the development of human cancers. *Journal of Molecular Medicine* 2014; 92(8): 811-823.
71. Alharbi RA, Pettengell R, Pandha HS, Morgan R. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. *Leukemia* 2013; 27(5): 1000-1008.
72. Andreeff M, Ruvo V, Gadgil S, et al. HOX expression patterns identify a common signature for favorable AML. *Leukemia* 2008; 22(11): 2041–2047.
73. Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, et al. Epigenomic analysis of the HOX gene loci reveals mechanisms that may control canonical expression patterns in AML and normal hematopoietic cells. *Leukemia* 2015; 29(6): 1279-1289.
74. WEB_1. (2018). NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3234> (12.01.2018).
75. Kanai M, Hamada JI, Takada M, et al. Aberrant expressions of HOX genes in colorectal and hepatocellular carcinomas. *Oncology Reports* 2010; 23(3): 843-851.
76. Hur H, Lee JY, Yun HJ, et al. Analysis of HOX gene expression patterns in human breast cancer. *Molecular Biotechnology* 2014; 56(1): 64-71.
77. Harada K, Yamazaki T, Iwata C, et al. Identification of targets of Prox1 during in vitro vascular differentiation from embryonic stem cells: functional roles of *HoxD8* in lymphangiogenesis. *J Cell Sci* 2009; 122(21): 3923-3930.
78. WEB_2. (2018). NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3235> (15.01.2018).
79. Tabuse M, Ohta S, Ohashi Y, et al. Functional analysis of *HOXD9* in human gliomas and glioma cancer stem cells. *Mol Cancer* 2011; 10: 60.
80. Takahashi Y, Hamada JI, Murakawa K, et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Experimental Cell Research* 2004; 293(1): 144-153.

81. Naito A, Iwase HT, Kuzushima T, et al. Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasms. *J Surg Oncol* 2001; 76(3): 176 – 180.
82. Makiyama K, Hamada JI, Takada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncology Reports* 2005; 13(4): 673-679.
83. Fromental-Ramain C, Warot X, Lakkaraju S, et al. Specific and redundant functions of the paralogous Hoxa-9 and Hoxd-9 genes in forelimb and axial skeleton patterning. *Development* 1996; 122(2): 461–472.
84. Lv X, Li L, Lv L, et al. HOXD9 promotes epithelial–mesenchymal transition and cancer metastasis by ZEB1 regulation in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 2015; 34(1): 133.
85. Cao H, Xu E, Liu H, Wan L, Lai M. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol Res Pract* 2015; 211(8): 557–69.
86. Taketani T, Taki T, Shibuya N, et al. The HOXD11 gene is fused to the NUP98 gene in acute myeloid leukemia with t(2;11) (q31; p15). *Cancer Research* 2002; 62(1): 33-37.
87. WEB_3. (2018). NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3237> (20.01.2018).
88. Cantile M, Schiavo G, Franco R, et al. Expression of lumbosacral HOX genes, crucial in kidney organogenesis, is systematically deregulated in clear cell kidney cancers. *Anti Cancer Drugs* 2011; 22(5): 392-401.
89. Hatırnaz Ö, Özbek U. Hematolojik Maligniteler; Moleküler Genetik Etiyoloji ve 2016 Dünya Sağlık Örgütü Sınıflaması. *Türkiye Klinikleri J Med Genet Special Topics* 2017; 2(2): 88-98.
90. Avcu N, Akçiçek G. Hematolojik Hastalıkların Çene Kemiklerindeki Bulguları. *Türkiye Klinikleri J Oral Maxillofac Radiol Special Topics* 2018; 4(1): 21-31.
91. WEB_4.(2015). Studylib. <http://studylibtr.com/doc/1259191/Hematolojik-Sistem> (20.01.2018).
92. Zhi F, Cao X, Xie X, et al. Identification of circulating microRNAs as potential biomarkers for detecting acute myeloid leukemia. *PloS One* 2013; 8(2): e56718.

93. WEB_5.(2015). National Cancer Institute.
<http://www.seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.htm> (24.12.2017).
94. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 23–47.
95. Forman D, Stockton D, Moller H, et al. Cancer prevalence in the UK: results from the Europrevall study. *Ann Oncol* 2003; 14: 648–654.
96. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc* 2006, 81: 247–260.
97. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4642–4649.
98. Mrozek K, Dohner H, Bloomfield CD. Influence of new molecular prognostic markers in patients with karyotypically normal acute myeloid leukemia: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2007; 14: 106-114.
99. Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1605.
100. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2008; 358: 1909-1918.
101. Garzon R, Volinia S, Papaioannou D, et al. Expression and prognostic impact of lncRNAs in acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111(52): 18679-18684.
102. Kern WF. PDQ Hematoloji (1. Baskı), Ferhanoğlu B, (Edt), İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2004: s440.
103. Jurkovicova D, Lukackova R, Magyerkova M, et al. microRNA expression profiling as supportive diagnostic and therapy prediction tool in chronic myeloid leukemia. *Neoplasma* 2015; 62(6): 949-958.
104. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 172–183.
105. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2015; 65: 5–29.

106. Berger U, Maywald O, Pffirman M, et al. Gender aspects in chronic myeloid leukemia: long term results from randomized studies. *Leukemia* 2005; 19: 984–989.
107. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet* 2007; 370(9584): 342-350.
108. O'Brien S, Berman E, Borghaei H, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7: 984–1023.
109. Hanfstein B, Muller MC, Hehlmann R, et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia* 2012; 26: 2096–2102.
110. Hochhaus A, Kreil S, Corbin As, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190–2196.
111. Al-Dewik NI, Elshami S, Nasser N, et al. Expression Profiling of Micro RNAs (MiRNAs) and Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients in the State of Qatar. *Blood* 2017; 130: 5243.
112. Watson JD, Crick FHC. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 1953; 171 (4356): 737–738.
113. Birben E. Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction (PCR)]. *Astım Allerji İmmünoloji* 2006; 4(2): 92-94.
114. WEB_ 6. (2016). <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (23.05 2016).
115. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qrt-pcr) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science* 2005; 109: 365-379.
116. Pınar A. PCR Ve Real-Time PCR Hakkında Genel Bilgi, Tıbbi Mikrobiyoloji Real Time PCR Kurs Kitapçığı, s 4-7, 04 Haziran 2012, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
117. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 29: 23–39.
118. Womg ML, Medrano JF. Review: Real Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39(1): 75-85.
119. Thompson T. *Tıbbi Genetik* (6. Baskı), Güneş Kitabevi, Ankara, 2005: s446.
120. WEB_7. (2018). https://lifescience.roche.com/en_tr/products/lightcycler14301-

- 480-instrument-ii.html (02.05.2018).
121. Fröhling S, Claudia S, Gary G, et al. Genetics of myeloid malignancies: Pathogenetic and clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 6285-6295.
 122. Ferrara F, Salvatore P, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Oncology Hematology* 2008; 66: 181-193.
 123. Wu S, Zheng C, Chen S, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts a poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Oncology Letters* 2015; 10(4): 2410-2414.
 124. Hao S, Shao Z. HOTAIR is upregulated in acute myeloid leukemia and that indicates a poor prognosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015; 8(6): 7223.
 125. Zhang YY, Huang SH, Zhou HR, et al. Role of HOTAIR in the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Oncology Reports* 2016; 36(6): 3113-3122.
 126. Xing CY, Hu XQ, Xie FY, et al. Long non-Coding RNA HOTAIR modulates C-KIT expression through sponging Mir-193a in acute Myeloid Leukemia. *FEBS Lett* 2015; 589: 1981-1987.
 127. Lin Y, Fang Z, Lin Z, et al. The prognostic impact of long noncoding RNA HOTAIR in leukemia and lymphoma: a meta-analysis. *Hematology* 2018; 1: 8.
 128. Sayad A, Hajifathali A, Hamidieh AA, et al. HOTAIR long noncoding RNA is not a biomarker for acute myeloid leukemia (AML) in Iranian patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(6): 1581-1584.
 129. Kotagama K, Chang Y, Mangone M. miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia. *Drug Development Research* 2015; 76(6): 278-285.
 130. Bernstein BE, Kellis M, Regev A, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458: 223-227.
 131. Wang H, Li Q, Tang S, et al. The role of long noncoding RNA HOTAIR in the acquired multidrug resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia cells. *Hematology* 2017; 22(4): 208-216.
 132. Rice KL, Licht JD. HOX deregulation in acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 865-868.

EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAİK-80)

| | |
|-----------------------|--|
| ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI | Hematolojik Maligniteli Hastalarda Uzun Kodlamayan HOTAIR RNA'nın Prognostik Önemi |
|-----------------------|--|

| | |
|----------------------------------|--|
| VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU | |
|----------------------------------|--|

| | | |
|----------------------|------------------|--|
| ETİK KURUL BİLGİLERİ | ETİK KURULUN ADI | ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU |
| | AÇIK ADRES | Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ |
| | TELEFON | 0 352 437 49 10 - 11 |
| | FAKS | 0 352 437 52 85 |
| | E-POSTA | byancar@erciyes.edu.tr |

| | | | | | |
|--|--|--|--|---------------------------------------|--|
| BAŞVURU BİLGİLERİ | KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI | Yard.Doc.Dr. Yagut Akbarova | | | |
| | KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI | Genetik | | | |
| | KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ | Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi/Kayseri | | | |
| | VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ ADI SOYADI | | | | |
| | DESTEKLEYİCİ | | | | |
| | PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için) | | | | |
| | DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ | | | | |
| | ARAŞTIRMANIN FAZ VE TÜRÜ | FAZ 1 | <input type="checkbox"/> | | |
| | | FAZ 2 | <input type="checkbox"/> | | |
| | | FAZ 3 | <input type="checkbox"/> | | |
| FAZ 4 | | <input type="checkbox"/> | | | |
| Gözlemsel ilaç çalışması | | <input type="checkbox"/> | | | |
| Tıbbi cihaz klinik araştırması | | <input type="checkbox"/> | | | |
| In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları | | <input type="checkbox"/> | | | |
| İlaç dışı klinik araştırma | | <input checked="" type="checkbox"/> | | | |
| Diğer ise belirtiniz | Yüksek Lisans Tezi | | | | |
| ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> | ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/> | ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> | ULUSLARARASI <input type="checkbox"/> | |

Etik Kurul Başkanı'nın
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

ASLI KOPYA

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

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

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KA EK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

| | |
|---------------------------------|--|
| ARAŞTIRMANN AÇIK ADI | Hematolojik Maligniteli Hastalarda Uzun Kodlamayan HOTAIR RNA'nın Prognostik Önemi |
| VARSA ARAŞTIRMANN PROTOKOL KODU | |

| DEĞERLENEN BELGELER | BELGE ADI | Tarhi | Versiyon Numarası | Dili | | |
|--------------------------------|---|---------------------|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | | ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ | | | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> |
| | İLGİLENDİRİLMİŞ BÖNÜLLÜ OLUR FORMU | | | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> |
| | OLGU RAPOR FORMU | | | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> |
| | ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ | | | Türkçe <input type="checkbox"/> | İngilizce <input type="checkbox"/> | Diğer <input type="checkbox"/> |
| DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER | BELGE ADI | Açıklama | | | | |
| | SİGORTA | | | | | |
| | ARAŞTIRMA BÜTÇESİ | | | | | |
| | BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU | | | | | |
| | ILAN | | | | | |
| | YILLIK BİLDİRİM | | | | | |
| | SONUÇ RAPORU | | | | | |
| | GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ | | | | | |
| DİĞER | | | | | | |
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No : 2015/222 | Tarih : 08.05.2015 | | | | |
| | Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. | | | | | |

KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

| | |
|--------------------------------------|--|
| ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI | İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu |
| ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI | Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL |

| Unvanı / Adı Soyadı | Uzmanlık Alanı | Kurumu | Cinsiyeti | Araştırma ile İlişki | Katılım (*) | İmza |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------|--|--|--|------|
| Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL | Çocuk Sağ ve Hast. | E.Ü. Tıp Fak. | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Prof. Dr. Sami AYDOĞAN | Fizyoloji | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Prof. Dr. Karamehmet YILDIZ | Anest. ve Rean. | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Prof. Dr. Salih KUK | Tıbbi Parazitoloji | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Prof. Dr. Kemal DENİZ | Patoloji | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Doç. Dr. Musa KARAKÜÇÜ | Çocuk Sağ ve Hast. | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Doç. Dr. Hüseyin ARINÇ | Kardiyoloji | Kayseri Eğitim Hast. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Doç. Dr. Erdem KILIÇ | Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi | E.Ü. Diş Hek. Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Doç. Dr. Aydın ÜNAL | İç Hastalıkları | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Yard. Doç. Dr. Afra EKİNCİ | Radyoloji | E.Ü. Tıp Fak. | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER | Farmakoloji | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI | Biyoistatistik | E.Ü. Tıp Fak. | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Av. Zafer Tuğrul SARIASLAN | Avukat | Hukuk Müşaviri | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Ecz. Şükran TERZİ | Eczacı | Serbest Eczacı | E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |
| Serkan KARACA | Sivi Üye | Öğretmen | E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> | E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/> | E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/> | |

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

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

HEMATOLOJİK HASTALIKLARDA UZUN KODLAMAYAN RNA HOTAİR'İN PROGNOSTİK ÖNEMİ

ORJİNALLIK RAPORU

| | | | |
|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| % 18 BENZERLİK ENDEKSİ | % 16 İNTERNET KAYNAKLARI | % 5 YAYINLAR | % 6 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |
|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------------|

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|---|-------------|
| 1 | docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı | % 3 |
| 2 | acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı | % 2 |
| 3 | docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı | % 2 |
| 4 | mmj.dergisi.org İnternet Kaynağı | % 1 |
| 5 | www.readperiodicals.com İnternet Kaynağı | % 1 |
| 6 | Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi | % 1 |
| 7 | www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 8 | İNAL, Behcet, ÖZRENK, Koray and ALTINTAŞ, Serdar. "Meyve Gelişimi ve Olgunlaşmasında Rol Oynayan Gen Düzenleyici Aktörler", | <% 1 |

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Esmâ BENTLİ

Uyruğu: Türkiye (T.C.)

Doğum Tarihi ve Yeri: 14 Kasım 1991, Malatya

Medeni Durumu: Bekâr

Tel : 0 538 0651560

Email : esmabentli@hotmail.com

Yazışma Adresi: K çik y M. Sağlık 1 S. 3/6 Talas/Kayseri

EĞİTİM

| Derece | Kurum | Mezuniyet Tarihi |
|--------|---|------------------|
| Lisans | İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü | 2013 |
| Lise | Atatürk Kız Anadolu Lisesi, Malatya | 2009 |

İŐ DENEYİMLERİ

| Yıl | Kurum | Görev |
|-----------|---|-----------------|
| 2015-2016 | Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Hematoloji- Onkoloji Hastanesi Akım Sitometri ve Hücre İŐleme Laboratuvarı | Biyolog |
| 2015-2016 | 114S352 nolu Tübitak projesinde bursiyer olarak görev yaptım. | Bursiyer |
| 2014-2015 | Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi, Genom Birimi | Biyolog |
| 2008–2008 | İnönü Üniversitesi Turgut Özal Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı | Stajyer  đrenci |

YABANCI DİL: İngilizce