

**KHUSAN KHODZHAEV**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINA AİT  
TÜM GENOM EKSPRESYON DATASINDA REGÜLATÖR  
MİRNA'LARIN SAPTANMASI VE VALİDASYONU**

**KHUSAN KHODZHAEV**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MUGE SAYITOĞLU**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2017**

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

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINA AİT  
TÜM GENOM EKSPRESYON DATASINDA REGÜLATÖR  
MİRNA'LARIN SAPTANMASI VE VALİDASYONU**

**KHUSAN KHODZHAEV**


**2. DANIŞMAN  
DR. ÖZDEN HATIRNAZ NG**

**GENETİK ANABİLİM DALI  
GENETİK PROGRAMI**

**İSTANBUL-2017**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Khusan KHODZHAEV tarafından Pro. Dr. Müge SAYİTOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan "**Akut Lenfoblastik Lösemi Hastalarına Ait Tüm Genom Ekspresyon Datasında Regülatör miRNA'ların Saptanması ve Validasyonu**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 29.06.2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
**Prof. Dr. Müge SAYİTOĞLU**  
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE  
Genetik Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Deniz TUĞCU**  
İ.Ü. İstanbul Tıp Fak.  
Çocuk Sağ.ve Hast. A.D.

  
İÜ İ.T.F. Çocuk Hematoloji Onkoloji  
Doç. Dr. Deniz TUĞCU  
Çocuk Hematoloji Onkoloji Uzmanı  
Dip. No: 25413 - 67849 - 84077

**Yrd. Doç. Dr. Yuk Yin NG**  
Bilgi Üni Mühendislik Fak.  
Genetik ve Biyomüh. Böl.



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Khusan Khodzhaev



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince teknik ve teorik desteklerini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Müge Sayitoğlu'na,

Her konuda bana destek olan ikinci danışmanım Dr. Özden Hatırnaz Ng'a,

Tez çalışmalarım süresince hasta bilgileri ve klinik analizleri konusunda desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Deniz Tuğcu'ya,

Sorun yaşadığımda usanmadan yardımcı olan Dr. Yücel Erbilgin, Uzm. Biyo. Sinem Fırtına ve Uzm. Biyo. Didem Altındirek'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Uğur Özbek'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi. Proje No: BAP-TYL-2016-21490 tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	3
İTHAF.....	5
TEŞEKKÜR.....	6
İÇİNDEKİLER .....	7
TABLolar LİSTESİ.....	9
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	10
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	11
ÖZET .....	12
ABSTRACT.....	13
GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
1. GENEL BİLGİLER .....	16
1.1. T hücre gelişimi ve T-ALL .....	16
1.1.1. Hematopoez .....	16
1.1.2. T hücre gelişimi .....	16
1.1.3. T-ALL genetik alt yapısı.....	17
1.2. Kodlama Yapmayan RNA'lar.....	18
1.2.1. Mikro RNA (miRNA).....	18
1.2.2. Hematopoezde miRNA .....	20
1.2.3. T hücre gelişiminde miRNA .....	22
1.2.4. T-ALL'de miRNA .....	22
1.2.5. miR-29 ailesi .....	23
1.2.6. TUBULİN 2A (TUBB2A) .....	24
1.3. miRNA hedeflerinin belirlenmesinde kullanılan biyoinformatik yaklaşımlar. ....	25
1.4. Tez Kapsamı/ Amacı.....	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
2.1. Gereç .....	28
2.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Örnekleri .....	28
2.1.2. Kontrol Örnekleri.....	29
2.1.3. Kimyasallar .....	29
2.1.4. Kullanılan Kitler .....	29
2.1.5. Kullanılan Cihazlar .....	29



2.2. Yöntem.....	30
2.2.1. Biyoinformatik analizler .....	30
2.2.2. Kullanılan Veritabanları.....	32
2.2.3. Kullanılan Analiz Programları .....	33
2.2.4. Lökosit İzolasyonu.....	34
2.2.5. Manyetik Boncuklar ile CD3+ Hücrelerin Ayrıştırılması.....	34
2.2.6. Trizol ile RNA İzolasyonu .....	35
2.2.7. Stem loop cDNA sentezi.....	36
2.2.8. Random hekzamer ile cDNA sentezi .....	38
2.2.9. qPZR .....	38
3. BULGULAR.....	40
3.1. Verilerin işlenmesi .....	40
3.1.1. Kalite kontrolü .....	40
3.1.2. Normalizasyon .....	43
3.1.3. Gen anlatım değişimi analizi.....	45
3.1.4. Veri entegrasyonu .....	48
3.2. miR-29 Ailesi Gen Anlatımı Bulguları.....	49
3.3. <i>TUBB2A</i> Gen Anlatımı Bulguları .....	50
3.4. <i>miR-28</i> ve <i>BACH 2</i> Bulguları.....	52
3.5. Mir-29 ailesi Gen Anlatımı ve Klinik Korelasyon Analizleri .....	53
3.6. <i>TUBB2A</i> Geni Anlatımı ve Klinik Korelasyon Analizleri.....	55
4. TARTIŞMA .....	58
KAYNAKLAR .....	63
HAM VERİLER .....	69
FORMLAR .....	72
ETİK KURUL KARARI .....	73
PATENT HAKKI İZİNİ .....	74
TELİF HAKKI İZİNİ.....	75
ÖZGEÇMİŞ .....	76

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 1 T-ALL hastalarının klinik özellikleri (MSS: Merkezi sinir sistemi tutulumu) .	28
Tablo 2: Kullanılan veritabanları .....	32
Tablo 3: Kullanılan analiz programları.....	33
Tablo 4: Stem-loop cDNA sentezi protokolü .....	36
Tablo 5: Random heksamer ile cDNA sentezi protokolü.....	38
Tablo 6: qPZR karışım içeriği .....	38
Tablo 7: qPZR'da kullanılan primer ve probler listesi .....	39
Tablo 8: Birbirleri ile ters yönde anlatım değişikliği gösteren miR:mRNA.....	48
Tablo 9: miRWalk veri tabanı çıktısı.....	49
Tablo 10: Ek tablo. DAVID zenginleştirme analizi. ....	69

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: miRNA biyogenezi (1) .....	19
Şekil 2: miR-29 ailesi. ....	24
Şekil 3: IPA programının ön yüzü .....	31
Şekil 4: IPA programında anlatımı ters korelasyon gösteren miRNA:mRNA çiftlerini gösteren pencere .....	31
Şekil 5: FACS ile hücre popülasyonu saflığı tayini.....	35
Şekil 6: Stem-loop cDNA sentezinin prensibi .....	37
Şekil 7: T-ALL hastalarında mikro dizi gen anlatımı (mRNA) analizlerinin kümelendirme verileri.....	41
Şekil 8: Örneklerin kalite kontrol değerlendirmesi A. NUSE grafiği, B. RLE grafiği... 42	42
Şekil 9: T-ALL mikro dizi gen anlatım (mRNA) verilerinin .....	43
Şekil 10: T-ALL örneklerinde miRNA gen anlatım array değerlerinin .....	44
Şekil 11: T-ALL mRNA mikroarray anlatımında filtreleme sonrası elde edilen 891 proba ait ısı haritası.....	46
Şekil 12: miRNA mikroarray anlatımına ait ısı haritası .....	47
Şekil 13: miR-29 ailesi ısı haritası .....	49
Şekil 14: miR-29 ailesi gen anlatımı bulguları .....	50
Şekil 15: TUBB isotiplerinin mikroarraydeki anlatımının ısı haritası.....	51
Şekil 16: <i>TUBB2A</i> relatif gen anlatımı düzeyleri .....	51
Şekil 17: A T-ALL ve priderik T hücresi. B T-ALL ve sağlıklı timosit hücreleri .....	52
Şekil 18: mir-29 ailesi üyeleri gen anlatımlarının klinik bulgularla olan ilişkileri.....	53
Şekil 19: miR-29 ailesi üyeleri anlatımı ve klinik bulgularla olan ilişkileri.....	54
Şekil 20: <i>TUBB2A</i> analrımı ve klinik bulgularla olan ilişkisi .....	55
Şekil 21: <i>TUBB2A</i> anatımı ve klinik bulgularla olan ilişkisi.....	56
Şekil 22 Sağkalım analizi. ....	57
Şekil 23: Cox regresyon analizi .....	57

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

MSS: merkezi sinir sistemi

T-ALL: T hücreli akut lenfoblastik lösemi

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

WBC: Beyaz Kan Hücresi (White Blood Cell)

miRNA: Mikro RNA

mRNA: Mesajcı RNA

RT PZR: Ters transkriptazlı polimeraz zincir reaksiyonu

UPL: Evrensel prob kütüphanesi

3' UTR: 3' transle edilmeyen bölge

5' UTR: 5' transle edilmeyen bölge

RISC: RNA aracılı susturucu kompleksi

## ÖZET

Khodzhaev, K. (2017). Akut Lenfoblastik Lösemi Hastalarına Ait Tüm Genom Ekspresyon Datasında Regülatör miRNA'ların Saptanması ve Validasyonu. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), olgunlaşan timositlerde görülen agresif malin hastalıktır. T-ALL, pediatrik ALL vakalarının %15'ini ve erişkin ALL vakalarının %25'ini temsil etmektedir. miRNA'lar tek iplikli, 19-25 nukleotit uzunluğunda olan ve endojen "hairpin" yapıdaki transkriptlerden köken alan RNA dizileridir. miRNA'lar, hedef mRNA'lara genelde 3' UTR bölgesindeki komplementerlik gösterdiği bölgeye bağlanarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. T-ALL ve diğer lösemi tiplerinin yanı sıra birçok kanser tipinde, miRNA'ların özgün anlatım profilleri sergiledikleri bilinmektedir.

Tez kapsamında, miRNA ve mRNA array ekspresyon verilerinin bir arada değerlendirilmesiyle T-ALL patogenezinde önemli olabilecek etkileşimlerin tespiti ve deneysel validasyonu amaçlanmıştır.

Mikroarray verilerinde yapılan gen anlatımı değişimi analizlerinde, *miR-29* ailesi üyelerinin anlatımında azalma karşı, hedeflerinden olduğu öngörülen *TUBB2A* anlatımında artış gözlenmiştir.

qPZR validasyonlarında, 52 pediatrik T-ALL hasta örnekleri kullanılmıştır. *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* anlatımlarının, T-ALL hastasında, sağlıklı periferik T hücrelerine göre anlatımlarının düşük olmasına karşın, sağlıklı timosit örneklerindeki anlatıma göre yüksek olduğu bulunmuştur. Buna karşılık, T-ALL ve sağlıklı timosit örneklerindeki *TUBB2A* anlatım seviyelerinin karşılaştırılmasında, T-ALL örneklerindeki *TUBB2A* anlatımının yüksek olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, T-ALL'de, *mir-29* ve öngörülen hedefi olan *TUBB2A* anlatımları ters yönde değil, ikisinin de anlatımının aynı yönde değiştiği gösterilmiştir.

*TUBB2A* anlatımı, WBC sayıları yüksek olan hasta grubunda yüksek olduğu, *TUBB2A*'nın daha kısa genel sağkalım ve hastalısız sağkalımla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Cox regresyon analizi sonuçlarına göre, *TUBB2A* anlatımının yüksek olması, tedaviye yanıtızsızlık ve nüks ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Biyoinformatik analiz bulgularının, farklı tekniklerle hastalığa özgü ve ilgili doğru sağlıklı kontrollerinde validasyonunun yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: T-ALL, mikroarray, *mir-29*, *TUBB2A*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi. Proje No: BAP-TYL-2016-21490, TÜBİTAK 119S395 ve İstanbul Kalkınma Ajansı, Geleceğe Yatırım: BİYOBANKA projesi (Proje No: TR10/15/YNK/0093) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

Khodzhaev, K. (2017). Regulatory miRNA Detection by Means of Analysing Whole Genome Expression Array Data of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis. İstanbul.

T cell acute lymphoblastic leukemia is a aggressive malign tümör which arises from aberrant development of thymocytes. T-ALL represents 15% of pediatric and 25% of ALL cases. microRNAs are 19-25 nucleotide long molecule which takes its origin from endogeneously coded hairpin transcripts. microRNAs have a role in regulating gene expression by means of binding to complementary sequences in 3'UTR of their target genes. T-ALL and other cancer types are known for their specific microRNA expression pattern.

This study aims at analysing combined mRNA and miRNA expression array data and reveal candidate interactions which may be important in T-ALL pathogenesis.

Differential gene expression analyses, carried out in both miRNA and mRNA expression array data had shown that significantly decreased expression of *miR-29* gene family corresponded to the increase of its candidate target gene *TUBB2A*.

Cohort of 52 pediatric patients were used in qPCR validation. miR-29a, miR-29b and miR-29c's expression levels were seen to be decreased in T-ALL compared to healthy control peripheral T cells. But when T-ALL samples were compared with healthy thymocyte subsets expression levels of miR-29 family members were seen to be elevated. Expression levels of *TUBB2A* in T-ALL samples were detected to be increased compared to thymocyte subsets. So the hypothesis of *miR-29* and *TUBB2A* to be in interaction did not hold true in T-ALL, because both of them were found to be upregulated.

When groups of patients having high or low WBC counts were compared, expression levels of *TUBB2A* were seen to be significantly higher in the group with high WBC count. Higher *TUBB2A* expression was correlated with shorter overall and disease free survival. Cox regression analyses had shown that increased *TUBB2A* expression is correlated with no induction response and also with relapse.

Findings of bioinformatics analyses should be validated with different techniques in respective disease and proper healthy control groups.

Key Words: T-ALL, microarray, *mir-29*, *TUBB2A*

Present work was supported by the research fund of İstanbul University. project no. BAP-TYL-2016-21490, TUBITAK 119S395 and İstanbul Development Agency, Investing In The Future: BIYOBANK (project no: TR10/15/YNK/0093).

## GİRİŞ VE AMAÇ

Kan, en yüksek rejeneratif dokulardan biridir ve günde yaklaşık  $10^{12}$  yeni hücre üretimi yapmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerden (HSC) kökenlenen hücreler lenfoid ve miyeloid olmak üzere iki ana yol üzerinden farklılaşmaktadırlar. Lenfoid yolu izleyen hücreler, kazanılmış ve doğumdan gelen immün sistemi hücreleri olan T-, B- ve doğal öldürücü (NK) hücrelerine farklılaşmak üzere gelişmektedirler.

İmmün sistemin parçası olan T hücreleri hematopoetik kök hücrelerden kökenlenmektedirler. Multipotent hücrelerden farklılaşan T hücreleri birçok kompleks basamak sonucunda olgunlaşmaktadırlar. Bu süreç esnasında birçok kritik evre mevcuttur; öncül hücrelerin çoğalması, T hücre farklılaşmasına yönelmeleri ve gen yeniden yapılanmalarının ardından üretimi yapılan T hücre reseptörü (THR) gibi. Çok sıkı seçim basamakları sonucu, T hücrelerinin major histokompatibilite kompleksine (MHC) özgü fakat “öz” kaynaklı antijenlere karşı reaktif olmamaları sağlanmaktadır. T hücresinin farklılaşması, gelişmesi ve seçimler sonucu “öz” ve “yabancı” ayrımını yapabilme özelliklerinin kazanmasındaki mikroçevre sağlama görevini timus üstlenmektedir. T hücresine farklılaşmak üzere timusa göç eden kök hücrelerine timosit adı verilmektedir.

T hücresi öncüllerinin çoğalması, farklılaşması ve gelişimi timustan kaynaklanan sitokinler, kemokinler, Wnt proteinleri ve Notch ligandları aracılığıyla olmaktadır.

T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), olgunlaşan timositlerde görülen agresif malin hastalıktır. T-ALL, pediatrik ALL vakalarının %15’ini ve erişkin ALL vakalarının %25’ini temsil etmektedir. T-ALL, klinikte yüksek lökosit sayısı, yüksek blast hücresi ve mediastinal lenf düğümlerinin büyümesiyle tanımlanmaktadır. Tarihsel olarak T-ALL kötü prognozlu bir hastalık olarak tanımlanmış olsa da, günümüzde kullanılan çoklu kemoterapi yaklaşımları ile sağkalım oranı pediatrik vakalar için %70’e, 60 yaş altı erişkinler için %30-40’a ve 60 yaş üstü hastalarda %10’a ulaşmıştır. Hastalığın nüksettiği hastalarda genelde kemoterapiye direnç gelişmekte ve bu vakalar kötü prognozla seyretmektedir. Dolayısıyla, yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi ve daha spesifik tedavilerin geliştirilmesi için, T-ALL’nin oluşması ve gelişmesine sebep olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

T-ALL’de görülen gen ve kromozom mutasyonlara ek olarak kodlama yapmayan küçük RNA’lar (miRNA) da lökomogenezde rolü olan mekanizmalardan birisidir.

miRNA’lar tek iplikli, 19-25 nukleotit uzunluğunda olan ve endojen “hairpin” yapıdaki transkriptlerden köken alan RNA dizileridir. miRNA’lar, hedef mRNA’lara genelde 3’ UTR bölgesindeki komplementerlik gösterdiği bölgeye bağlanarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz ve strese cevap gibi temel işlevlerin düzenlenmesinde rol almaktadır.

T hücre gelişimi timusta meydana gelmektedir ve DN, DP ve SP evrelerini izleyen T hücresi CD4+ veya CD8+ T hücrelerine farklılaşmaktadır. CD4 hücreleri daha sonra Th1, Th2, Th17 veya Treg alt tiplerine farklılaşabilirken, CD8 hücreleri sitotoksik T hücresine farklılaşabilmektedir. Bu gelişim evrelerinin – DN evresinden farklılaşmış T hücrelerine kadar – kendine özgü miRNA anlatım profillerine sahip olduğu bilinmektedir. Birçok miRNA, kritik rolü olan tümör supresör genlerin anlatımını baskılayarak lösemi gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Bu tez amacı, biyoinformatik analizler ile miRNA ve mRNA microarray verilerinin bir arada değerlendirilmesi, öne çıkan miRNA ve hedef mRNA anlatımlarının validasyonu ve olası klinik önemleri araştırmaktır.



## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. T hücre gelişimi ve T-ALL

#### 1.1.1. Hematopoez

Kan, en yüksek rejeneratif dokulardan biridir ve günde yaklaşık  $10^{12}$  yeni hücre üretimi yapmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerden (HSC) kökenlenen hücreler lenfoid ve miyeloid olmak üzere iki ana yol üzerinden farklılaşmaktadırlar. Lenfoid yolu izleyen hücreler, kazanılmış ve doğumdan gelen immün sistemi hücreleri olan T-, B- ve doğal öldürücü (NK) hücrelerine farklılaşmak üzere gelişmektedirler. Miyeloid yolu izleyen kök hücreler ise, granülositleri (nötrofil, eozinofil, mast hücreleri ve bazofiller), monositleri, eritrositleri ve megakaryositleri meydana getirmek üzere farklılaşmaktadırlar (2).

Hematolojik hastalıklar genelde malign olmayan (anemi, primer immün yetmezlikler, miyeloproliferatif ve miyelodisplastik sendromlar gibi) ve malign (miyeloid ve lenfoid lösemiler gibi) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (2).

#### 1.1.2. T hücre gelişimi

İmmün sistemin parçası olan T hücreleri hematopoetik kök hücrelerden kökenlenmektedirler. Multipotent hücrelerden farklılaşan T hücreleri birçok kompleks basamak sonucunda olgunlaşmaktadırlar. Bu süreç esnasında birçok kritik evre mevcuttur; öncül hücrelerin çoğalması, T hücre farklılaşmasına yönelmeleri ve gen yeniden yapılanmalarının ardından üretimi yapılan T hücre reseptörü (THR) gibi. Çok sıkı seçim basamakları sonucu, T hücrelerinin major histokompatibilite kompleksine (MHC) özgü fakat “öz” kaynaklı antijenlere karşı reaktif olmamaları sağlanmaktadır. T hücresinin farklılaşması, gelişmesi ve seçimler sonucu “öz” ve “yabancı” ayrımını yapabilme özelliklerinin kazanmasındaki mikroçevre sağlama görevini timus üstlenmektedir. T hücresine farklılaşmak üzere timusa göç eden kök hücrelerine timosit adı verilmektedir.

T hücresi gelişimi, CD4 ve CD8 başta olmak üzere birçok hücre yüzeyi proteinlerine göre birkaç evrede incelenebilmektedir. Bu evreler, gelişim sırasına göre hem CD4 hem de CD8'in anlatımının yapılmadığı CD4(-)CD8(-) çift negatif “double negative=(DN)”, CD3'ün negatif fakat CD4'ün pozitif olduğu CD4(+)CD3(-) immatür

tek pozitif “immature single positive=(ISP)”, hem CD4’ü hem CD8’in pozitif olduğu CD4(+)CD8(+) çift pozitif “double positive=(DP)”, yardımcı T hücresi olan CD4(+)CD3(+) ve sitotoksik T hücresi olan CD8(+)CD3(+) evreleridir. CD3, THR parçası olduğu için, CD3’ün pozitif olması T hücresinin fonksiyonel THR anlatımı yaptığını gösterir.

T hücresi öncüllerinin çoğalması, farklılaşması ve gelişimi timustan kaynaklanan sitokinler, kemokinler, Wnt proteinleri ve Notch ligandları aracılığıyla olmaktadır (3).

### 1.1.3. T-ALL genetik alt yapısı

T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), olgunlaşan timositlerde görülen agresif malin hastalıktır. T-ALL, pediatrik ALL vakalarının %15’ini ve erişkin ALL vakalarının %25’ini temsil etmektedir. T-ALL, klinikte yüksek lökosit sayısı, yüksek blast hücresi ve mediastinal lenf düğümlerinin büyümesiyle tanımlanmaktadır. Tarihsel olarak T-ALL kötü prognozlu bir hastalık olarak tanımlanmış olsa da, günümüzde kullanılan çoklu kemoterapi yaklaşımları ile sağkalım oranı pediatrik vakalar için %70’e, 60 yaş altı erişkinler için %30-40’a ve 60 yaş üstü hastalarda %10’a ulaşmıştır. Hastalığın nüksettiği hastalarda genelde kemoterapiye direnç gelişmekte ve bu vakalar kötü prognozla seyretmektedir. Dolayısıyla, yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi ve daha spesifik tedavilerin geliştirilmesi için, T-ALL’nin oluşması ve gelişmesine sebep olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir (4).

T hücresinin transformasyonu, timosit gelişiminden sorumlu genlerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler sonucu, hücre büyümesi, çoğalması ve sağkalımı gibi süreçleri kontrol eden mekanizmaların bozulmasıyla seyreden çok kademeli bir süreçtir. Bu süreçlerin tetiklenmesinde, hücre yolaklarının devamlı aktif olmasına sebep olan mutasyonlar (örneğin, T-ALL’nin >%60’ında görülen NOTCH1 yolağı); hücre döngüsünden sorumlu moleküllerdeki mutasyonlar (örneğin, T-ALL’nin %70’inde görülen CDKN2 lokusundaki *p16INK4A* ve *p14ARF* tümör baskılayıcı genleri); normal timositlerde anlatımı yapılan (örneğin *MYC*, %1) ve yapılmayan (örneğin *TAL1*, *TAL2*, %3) transkripsiyon faktörlerinin anlatımındaki artışa ve/veya anlatım kaybına (örneğin, *LEF1*(%15), *ETV6* (%13), *BCL11B* (%10), *RUNX1*(%10-20), *GATA3* (%5)), kromatin düzenlenmesinde görevli moleküllerdeki mutasyonlar (*EZH2* (%10-15), *SUZ12* (%10), *PHF6* (%20-40)) ve hücresel sinyal ileti yolaklarında görevli

moleküllerdeki mutasyonlar (*PTEN* (%17), *ABL1* (%8), *RAS* (%5-10), *JAK2* (%4-18), *JAK3* (%5), *FLT3* (%2-4), *IL7R* (%10)) tespit edilen genomik anomaliler arasındadır (4,5).

T-ALL'de görülen gen ve kromozom mutasyonlara ek olarak kodlama yapmayan küçük RNA'lar (miRNA) da lökomogenezde rolü olan mekanizmalardan birisidir (6).

## 1.2. Kodlama Yapmayan RNA'lar

Genomun kodladığı RNA'ların büyük bir kısmının protein karşılığı bulunmamaktadır. Bu kodlama yapmayan RNA'lar, hem yapı hem fonksiyon açısından büyük çeşitliliğe sahiptir. RNA'lar hakkındaki bilgilerin artmasıyla beraber, kodlama yapmayan RNA'ların, hücre çoğalması, farklılaşması, apoptoz, strese karşı cevap ve genomun stabilitesi dahil bir çok yolak üzerinde etkili oldukları anlaşılmaktadır. Kodlama yapmayan RNA genlerindeki genetik ve epigenetik değişimler, kanser gibi kompleks hastalıklarda önem arz etmektedir (7).

### 1.2.1. Mikro RNA (miRNA)

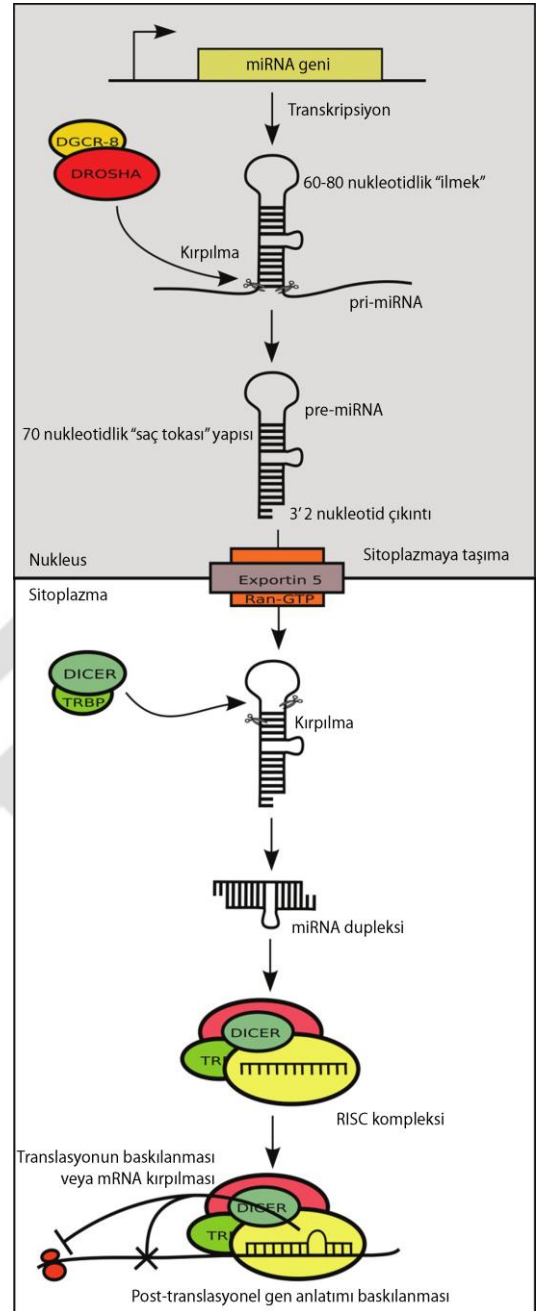
miRNA'lar tek iplikli, 19-25 nukleotit uzunluğunda olan ve endojen "hairpin" yapıdaki transkriptlerden köken alan RNA dizileridir. miRNA'lar, hedef mRNA'lara genelde 3' UTR bölgesindeki komplementerlik gösterdiği bölgeye bağlanarak gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması, apoptoz ve strese cevap gibi temel işlevlerin düzenlenmesinde rol almaktadır (8).

Bütün miRNA'ların %40'ı kadarı küme (cluster) şeklinde bulunur ve genellikle aynı biyolojik yolağın kontrolünden sorumludurlar (1). Olgunlaşmamış miRNA transkriptleri, 60-80 nukleotid uzunluğundadır 'loop' şeklindedir; bu moleküller RNase III endoribonukleaz ailesinden olan DROSHA enzimi tarafından nukleusta işlenir ve yaklaşık 70 nukleotid uzunluğunda olan ve 3' ucunda 2 nukleotid çıkıntısı olan pre-miRNA meydana getirir (Şekil 1). 'Hairpin' yapısında olan bu molekül eksportin5 tarafından sitozole taşınır. Sitozoldeki pre-miRNA'lar DICER tarafından işlenerek 21-25 nukleotid uzunluğundaki çift iplikli miRNA'lar haline alır. Olgun hale gelen miRNA'nın bir ipliği uzaklaştırılır (miR\*) ve diğer ipliği ("guide strand") post-transkripsiyonel gen susturmasında işlev gören RISC ("RNA induced silencing

complex”) yapısındaki AGO (ARGONAUTE) proteini yapısına dahil olur (9,10). Uzaklaştırılıp kullanılmayan ipliğin akıbeti bilinmemesine rağmen bu RNA parçalarının eksozomlarla hücreden dışarı atıldığı düşünülmektedir, çünkü vücut sıvılarında miRNA’lar saptanabilmekte ve günümüzde bu miRNA’ların kanser tanısında belirteç olarak kullanılması konusu büyük bir ilgi çekmektedir (1). Kanonik miRNA biyogenezi yolunu izlemeyen miRNA’ların bir kısmı (mirtron), kırılan intronlardan meydana gelmektedir ve DROSHA aktivitesine gereksinim duymaksızın olgunlaşmaktadırlar (11).

miRNA, RNA sessizleştirilmesi veya RNAi (“RNA interference”) olarak bilinen gen anlatımının baskılanması mekanizmasında görevli moleküllerden biridir. Bu mekanizmanın anlaşılmasında kullanılan *C.elegans* deneylerinde organizmaya verilen RNA moleküllerinin tek iplikli değil çift iplikli olması halinde (dsRNA) bu yolağın daha etkili bir şekilde aktifleştigi görülmüştür.

*C.elegans*’ın kullanıldığı araştırmalarda bu mekanizmada görevli genler tanımlanmıştır. Elde edilen verilerin kullanılmasıyla birçok organizmada bu genlerin homologları olduğu anlaşılmıştır ve bu organizmalarda posttranskripsiyonel gen sessizleştirilmesi (PTGS), ‘co-suppression’, ‘quelling’ ve RNAi olarak bilinen bu mekanizmalarda ortak özellikler paylaşılmaktadır. Bu yolağın aktifleşmesinde DICER tarafından işlenmesiyle oluşan çift iplikli RNA molekülü ana eleman olarak görülmektedir (12,13). miRNA ve siRNA (“small interfering RNA”) temel işlevleri ve biyokimyasal yapıları bakımından (20-25 nükleotid uzunluğunda, 5’- fosfat ve 3’-hidroksil içeren dizi) aynıdır. miRNA ve siRNA ayrımı bu iki molekülün biyogenezi bakımından yapılabilir – siRNA’lar endojen veya ekzojen kaynaklı dsRNA molekülleridir (‘hairpin’ veya çift iplik şeklinde) ve bunların



Şekil 1: miRNA biyogenezi (1)

işlenmesi sonucu genelde çift iplikli RNA'nın her iki kolundan işlevsel dizi meydana gelmektedir. miRNA ise endojen kaynaklı 'hairpin' yapısındaki moleküldür ve işlenmesi sonucu genelde gen anlatımı susturulmasında çift iplikli ürününün tek ipliği kullanılmaktadır (14).

miRNA ve siRNA molekülünün RISC tarafından yapısına alınmasından önce bu öncül çift iplikli moleküllerin birinin seçilmesi önem arz etmektedir, çünkü seçilen diziye komplementer olan mRNA hedef dizisi tanınarak transkriptin proteine çevrilmesi engellenmektedir. DICER tarafından işlenerek çift iplikli hale gelen bu iki molekülün bir ipliği 'anti-sense' (mRNA'daki hedef diziye komplementer) ve bu ipliğin komplementeri olan 'sense' (miR\*) iplik olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda tanımlanmış olan miRNA öncüllerinin termodinamik analizleri sonucu çift iplikli molekülün 'anti-sense' ipliğinin 5' ucunun daha az kararlı olduğu bulunmuştur, dolayısıyla RISC tarafından iki ipliğin çözülmesi esnasında ATP ile gerçekleşen süreçte 'anti-sense' ipliği daha çok tercih edilmektedir (12,13).

Hayvanlardaki miRNA'lar, hedef mRNA'larının kısmi komplementerlik gösterdikleri 3' UTR bölgesindeki dizileri tanıyarak bağlanırlar. mRNA'nın 3' UTR dizisine bağlanan miRNA'nın 5' ucundaki 2. - 7. Nukleotidleri arasındaki bölge "seed" olarak bilinmektedir. miRNA'nın 3' ucunun hedef diziye bağlanmasının daha az önem arz ettiği düşünülmektedir, fakat, özellikle miRNA'nın 5' ucunun hedef mRNA dizisiyle daha zayıf etkileşmesi durumunda, miRNA'nın 3' dizisinin mRNA'ya bağlanması, miRNA'nın etkisini güçlendirebileceği bilinmektedir. miRNA'nı orta kısımlarının (9-12. nukleotidler) çıkıntı ("bulge") yaparak mRNA'ya bağlanması durumunda hedef transkriptin translasyonel baskılanması veya eksonukletik kırılmasının ayol açmaktadır. miRNA'nın hedef transkriptte tanıdığı bölgeye tamamen komplementerlik göstermesi durumunda (hayvanlarda nadirdir, fakat bitkilerde yaygın etkileşim tipidir) mRNA kesilerek parçalanmaktadır (15).

### 1.2.2. Hematopoezde miRNA

Embriyonik kök (EK) hücrelerdeki *NANOG*, *OCT4* ve *SOX2* gibi genlerin anlatımındaki baskılanma ve kök hücrelerin farklılaşmasını tetikleyen aktivatörlerin anlatımının artmasına eş olarak miRNA anlatım profilinin de değiştiği bilinmektedir. miRNA'ların EK hücre biyolojisindeki önemi, *Dicer* geni delesyonunun yapıldığı deneyler sonucu anlaşılmıştır. Farede yapılan bu deneylerde, *Dicer* geninin delesyonu

sonucu, erken gelişim evrelerinde morfolojik anomaliler ve embriyoların ölümü gözlenmiştir (16).

*Dicer* geninin, özellikle hematopoetik kök (HK) hücre kompartmanındaki delesyonunun oluşturulduğu çalışmada ise, apoptozun artması sonucu işlevsel HK hücrelerinin oluşmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, *miR-125a*'nın tek başına HK hücresinin kendini yenileyebilme özelliğinin ve sayısının koruması için yeterli olduğu ve apoptoza gitmesine engel olabildiği gösterilmiştir (17).

Petriv ve arkadaşlarının fare modelinde yaptığı çalışmada, hematopoetik hiyerarşiyi temsil eden 27 farklı hücre tipindeki 288 miRNA anlatım seviyeleri incelenmiştir (18). Elde edilen anlatım verilerine göre yapılan kümeleme analizinde, 27 hücre tipi 6 büyük gruba ayrıldığı – kök ve multipotent hücreler, lenfoid ve 4 grup miyeloid hücre hattı – gösterilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre, *miR-125b*, *miR-196a*, *miR-196b*, *miR-130a*, *let-7d*, *miR-148b* ve *miR-351* kök hücre ve progenitörlerde, farklılaşmış hücrelere göre daha yüksek anlatım göstermektedir. Bu öncü hücrelerde anlatımı düşük olan miRNA'lar arasında ise, *miR-140*, *miR-200c*, *miR-484*, *miR-331* ve *miR-324-5p* gözlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, hiçbir miRNA sadece farklılaşmış hücrelere özgü anlatımı tespit edilmemiştir; fakat *miR-484*, *miR-200c*, *miR-331*, *miR-320*, *miR-210*, *miR-324-5p*, *miR-212* ve *miR-690* anlatımı primitif hücrelerde düşük olması ve aksine birçok farklılaşmış hücrede yüksek anlatım göstermesi, bu miRNA'ların farklılaşmayı tetikleyen aday miRNA'lar olduğunu göstermektedir (18).

CD34+ hücrelerinin öncülü olan ve hematopoetik hücrelere kaynak oluşturan CD133+ hücre kompartmanında yapılan çalışmada kombine miRNA-mRNA anlatım profilleri, HK hücrelerin özelliklerinin korunmasında önemli miRNA'ların tespiti açısından incelenmiştir. miRNA-hedef çiftleri arasında, yüksek *miR-29a* ve anlatımı düşük olan hedefi *TMP1* ve WNT yolağındaki *FZD5* reseptörü öne çıkmıştır (19). *miR-29a*, ayrıca fare modelinde erken hematopoez ve miyeloid farklılaşmanın kontrolünde önemli rol üstlendiği gösterilmiştir. İlgili çalışmada, *miR-29a*'nın öncül progenitörlerde yüksek anlatıma sahip olduğu; geç evrelerde ise anlatımının azaldığı ve dolayısıyla farklılaşmamış hücrelerin kök hücre özelliğini korumasında önemli olabileceği gösterilmiştir (20). Fare modelinde, HK hücrelerindeki *miR-29a*'nın ektopik anlatımı, myeloid prekürsörlerindeki kendini yenileyebilme özelliğinin artmasına, myeloid hücre hattına farklılaşmanın artmasına, myeloproliferatif hastalıkların ve AML'nin oluşmasına sebep olduğu gösterilmiştir. Farede gözlenen AML benzei

hastalığın gelişmesiyle tutarlı olarak, AML hastalarında da *miR-29a*'nın anlatımının yüksek olduğu bilinmektedir (20).

### 1.2.3. T hücre gelişiminde miRNA

T hücre gelişimi timusta meydana gelmektedir ve DN, DP ve SP evrelerini izleyen T hücresi CD4+ veya CD8+ T hücrelerine farklılaşmaktadır. CD4 hücreleri daha sonra Th1, Th2, Th17 veya Treg alt tiplerine farklılaşabilirken, CD8 hücreleri sitotoksik T hücresine farklılaşabilmektedir. Bu gelişim evrelerinin – DN evresinden farklılaşmış T hücrelerine kadar – kendine özgü miRNA anlatım profillerine sahip olduğu bilinmektedir (21).

*miR-17-92* kümesinin, T hücre öncüllerinde yüksek anlatım yaptığı, hücre farklılaşmasıyla beraber anlatımının azaldığı bilinmektedir. Bu miRNA kümesi hedefleri arasında *Bim* (“Bcl-2-interacting mediator of cell death”) ve bir diğer tümör baskılayıcı gen olan *PTEN* yer almaktadır. *miR-17-92* transfeksiyonu yapılan farede, lenfositlerin, özellikle CD4 T hücresinin, çoğalmasının ve sağkalımının arttığı gözlenmiştir (22,23). *miR-125b* naif CD4+ T hücrelerinin gelişmesinde önemlidir. Bu miRNA'nın anlatımı ile hedefleri arasında yer alan IFN- $\gamma$ , IL-2  $\beta$  reseptörü, IL-10  $\alpha$  reseptörü ve Blimp-1 genlerinin baskılamasından sorumludur (24). *miR-181a* ise, T hücrelerinin olgunlaşmasında, özellikle T hücrelerinin timustaki negatif seleksiyonunda önemli yplakların kontrolünden sorumludur (25). *miR-155* ise *SOCS1* hedef aldığı ve regülatör T hücrelerinin sağkalımında önemli olduğu bilinmektedir (26). *miR-182*, hedefleri genlerinden olan *FOXO1* aracılı regülatör T hücre sağkalımından sorumludur (27).

### 1.2.4. T-ALL'de miRNA

Birçok miRNA, kritik rolü olan tümör supresör genlerin anlatımını baskılayarak lösemi gelişimine katkıda bulunmaktadır. Örnek olarak, *miR-17~92* kümesi verilebilir. Bu kümenin anlatımı, Burkitt lenfomasında, lenfoma gelişiminde ve deneysel modellerdeki T-ALL gelişiminde görülebilmektedir. miRNA'ların onkogenik etkileri, birden fazla miRNA'nın ortak hedefler üzerinde etki göstermeleri halinde daha da artabilmektedir. Örneğin T-ALL'de 5 miRNA'nın (*miR-19b*, *miR-20a*, *miR-26a*, *miR-92* ve *miR-223*) çok az sayıdaki (örneğin, *Pten* ve *Fbxw7*) tümör baskılayıcı gen üzerinde

gösterdikleri ortak etkisi sonucu söz konusu hedeflerin anlatımı belirgin derecede azalmaktadır (6).

T-ALL'ye özgü tümör baskılayıcı miRNA'ları tanımlamayı amaçlayan Sanghvi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonuçlarına göre, *miR-29*, *miR-31*, *miR-150*, *miR-155* ve *mir-200c* tümör baskılayıcı olarak davranmaktadır ve bu miRNA'ları kodlayan genlerdeki inaktivasyon/ anlatımındaki azalma lösemnin gelişimine yol açabilmektedir. *miR-150*, *miR-155* ve *miR-200c*'ün hedefledikleri ortak geni olan *Myb*, T-ALL'de görülen translokasyon sonucu *Myb* aktivasyonuna sebep olan (t(6;7)(q23;q34), T-ALL'nin %3'ünde (5)) mekanizmaya alternatif bir süreç oluşturmaktadır. *Myb* overekspresyonu, immatür T hücrelerin olgunlaşmasını engellemektedir. *miR-29* ve *miR-39*'un ise (*miR-155* ve *miR-200* ile birlikte) transkripsiyon faktörü olan *Hbp1*'i hedeflemekte. Bu araştırma grubunun elde ettikleri sonuçlara göre, *Hbp1*'in hücre siklüsü regülatörü olan p21'i baskılaması ve T hücrelerindeki CD2'nin anlatımını teşvik etmesinin yanı sıra lösemi gelişiminde de rol almaktadır (6).

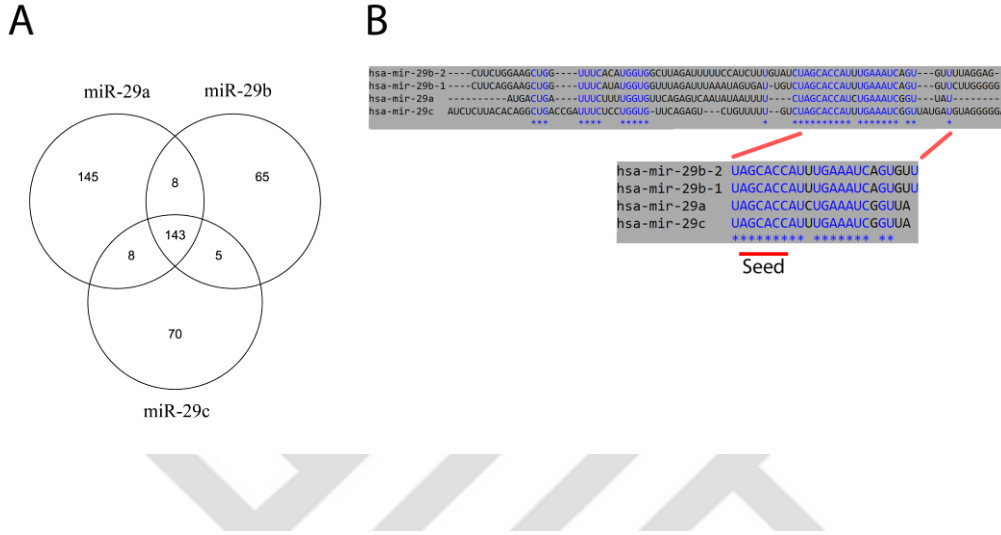
### 1.2.5. miR-29 ailesi

miR-29 ailesinin klinik önemi, ilk Calin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile, miR-29 ailesi üyelerinin anlatım seviyesindeki azalmanın, kronik lenfositik lösemi (CLL) hastalığında kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (28). *miR-29*'un karsinogenez ve prognoz üzerindeki etkisinin, TGF-B (transforming growth factor), BMP ("bone morphogenetic protein"), EGF ("endothelial growth factor"), FGF ("fibroblast growth factor"), WNT) ve diğer transkripsiyon faktörleri üzerinden olduğu belirlenmiştir. *miR-29* anlatımı, *c-MYC*, *p53*, *CEBPA* tarafından regüle edilebilmektedir. Ayrıca, *miR-29* anlatımının, NF-kB tarafından YY1 aracılı regüle edilebildiği bilinmektedir (29). *miR-29* ailesi üyelerinin ekspresyonundaki bozukluklar, nazofarengeal karsinoma (NPC, "nasopharyngeal carcinoma") (30), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC, "non-small cell lung cancer") (31), hepatoselüler karsinom (HCC, "hepatocellular carcinoma") (32), diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL, "diffuse large B cell lymphoma") (33), meme kanseri (34) ve kütanöz melanoma (CM, "cutaneous melanoma") (35) gibi kanser tiplerinde gösterilmiştir (36).

miR-29 ailesi, *miR-29a*, *miR-29b-1*, *miR-29b-2* ve *miR-29c* üyelerinden oluşmaktadır. *miR-29a* ve *mir-29b-1* 7. kromozomdan tek transkript şeklinde sentezlendikten sonra olgunlaşmaktadırlar. *miR-29b-2* ve *mir-29c* tek transkript şeklinde,



1. kromozomdan transkribe olmaktadır. Olgun mir-29 üyelerinden (stem loop yapısındaki 3p kolu) mir-29b-1 ve mir-29b-2 birebir aynıdır, fakat dört miRNA'nın da seed dizileri aynıdır (Şekil 2B) dolayısıyla, hedefledikleri mRNA'ların çoğu ortaktır (Şekil 2A) (29,37,38).



**Şekil 2: miR-29 ailesi.**

**A** miR-29 üyelerinin ortak valide hedefleri (miRTarBase release 6.0, 15.9.2015).

**B** miRBase dizilerinin karşılaştırılması (<http://workbench.sdsc.edu/> hizalaması)

### 1.2.6. TUBULİN 2A (TUBB2A)

Mikrotübüller hücre iskeletini oluşturan polimerlerden biridir ve mitoz, hücre içi transport, nöronların asimetric morfolojileri, siliar ve flagellar hareketler gibi kritik fonksiyonarda rol almaktadırlar. Mikrotübüller,  $\alpha$  ve  $\beta$ -tubulin izotiplerinden oluşan heterodimer polimerlerdir ve bu izotiplerin biraraya gelmesi veya parçalara ayrılabilmesi ile mikrotübüllere dinamik özellik kazandırmaktadırlar. İnsanlarda 7 adet  $\alpha$  ve 8 adet  $\beta$  izotipini kodlayan gen bulunmaktadır (39).  $\alpha$  ve  $\beta$  izotipleri kendi içinde yüksek korunmuşluğu sahiptir ve farklılığın neredeyse tamamı C terminal bölgesindeki 15-20 amino asitlik dizidedir (40). *TUBB2A* ve *TUBB2B* 6. kromozomda peşi sıra yerleşmiştir ve bu iki protein sadece C terminalde 2 amino asitlik farklılığa sahiptir. Kurbağa genomu incelendiğinde *TUBB2A*'nın karşılığı bulunmamıştır ve dolayısıyla, *TUBB2A*, yakın geçmişte *TUBB2B*'nin duplikasyonu sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (40). Bazı tubulin izotiplerinin belli dokulara özgü anlatım yaptıkları bilinmektedir. Farklı doku tiplerinde (n=21) yapılan bir çalışmada, *TUBB* ve *TUBB2C* anlatımının beyin ve lökositler hariç bütün doku tiplerinde yüksek olduğu; *TUBB1*

anlatımının hematopoetik sistemde ve *TUBB2A*, *TUBB2B*, *TUBB3* ve *TUBB4* anlatımının özellikle beyinde yüksek olduğu gösterilmiştir (40). “Nöron spesifik” anlatım yapan izotipler olarak bilinen bu tubulinlerden, özellikle *TUBB2A*’nın, lenfositler dahil, diğer doku tiplerinde de anlatımının yapıldığı bilinmektedir (40-42). Tubuline bağlanan ajanlar (TBA, tubulin binding agents),  $\alpha$ - $\beta$  heterodimerindeki  $\beta$  tubulinlerine bağlanmaktadır ve anti-mitotik ajan olarak kullanılan birçok kemoterapi ilacının aktif maddesidir (43).

Represör transkripsiyon faktörü olan *BACH2*, B hücre gelişiminde önemlidir. *Bach2* “knock-out” farelerinin germinal merkezleri oluşturamadıkları bilinmektedir. *Bach2*, T hücre aracılı olan ve olmayan IgG cevabının oluşumunda önemlidir (44). *BACH2* anlatımının DLBCL hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. *BACH2*’nin anlatımı, efektör T hücresiyle ilgili yolları baskılayarak naif CD4 T hücrelerinin devamlılığı sağlamaktadır (45). Bir diğer çalışmada ise, *BACH2* anlatımının, memory CD8 hücrelerinin gelişmesinde önemli olduğu gösterilmiştir (46).

Christof Schneider ve arkadaşları, B hücreli lenfoma hastalarındaki *miR-28-5p*’nin anlatımının düşük olduğunu ve hücre hatlarındaki bu miRNA’nın yüksek anlatımının hücre çoğalmasını olumsuz etkilediğini göstermişlerdir (47). *miR-28-5p* yüksek anlatımı, özofagus (48), over (49) ve renal kanserlerinde (50) gözlenmiştir .

### 1.3. miRNA hedeflerinin belirlenmesinde kullanılan biyoinformatik yaklaşımlar.

miRNA:mRNA etkileşiminin tespitindeki zorluklardan biri, bir miRNA’nın birden fazla hedefinin olması ve tek mRNA’yı hedefleyen birden fazla miRNA’nın olabilmesidir. Dolayısıyla, tek mRNA’nın baskılanmasında birden çok miRNA görevli olabileceği için, hedef transkriptin seviyesindeki değişim her doku tipinde ve/veya hastalık tipinde aynı derecede etkilenmeyebilir. Bu engelin aşılmasındaki çözümlerden biri, miRNA:hedef mRNA çiftinin öngörü araçlarıyla belirlenmesinin ardından bu etkileşimin deneysel validasyonudur (51). Günümüzde bu etkileşimlerin öğrenülmesinde izlenen birçok algoritma ve biyoinformatik araç geliştirilmiştir.

miRNA dizisi üzerinden hedef transkriplerinin tahmininde birçok algorithmada kullanılan aşağıdaki ana kriterler sayılabilir:

- mRNA’nın 3’ UTR dizisi – birçok algoritma, miRNA dizisine komplementerlik gösteren bölge olarak mRNA’nın 3’ UTR bölgesini kullanmaktadır, çünkü

çalışmaların gösterdiği gibi miRNA'ların hedef olarak en sık kullandıkları bölge transkriptin 5' ucudur (52,53).

- “Seed” dizisi – miRNA'nın 5' ucundaki 2.-8. nukleotidler arasındaki dizi olarak tanımlanmaktadır ve bu dizi hedef mRNA'da bağlandığı diziyi tam komplementerlik göstermektedir (54).
- miRNA: mRNA etkileşimindeki serbest enerji – birçok öngörü algoritması, etkileşimin stabilitesinin göstergesi olarak miRNA'nın mRNA üzerindeki diziyeye bağlanması halinde açığa çıkan serbest enerjiyi de dikkate almaktadır (55). Ayrıca, PITA gibi bazı algoritmalar, mRNA'nın kendi üzerindeki katlanmaların da miRNA'nın hedef diziyeye bağlanmasının etkilenebileceğini de dikkate almaktadır (56).
- miRNA'nın 3' dizisi etkileşimi – miRNA'nın 13.-16. Nukleotidlerinin hedef diziyeye etkileşiminin, hedef genin anlatımının baskılanmasının daha etkili hale getirdiği, gösterilmiştir (57). Bu kriter, TargetScan (58) ve miRanda (59) gibi algoritmalarda kullanılmaktadır.
- Korunmuşluk – miRNA'nın hedef dizide bağlandığı bölgenin korunmuşluğu, bu dizinin evrimsel süreçte pozitif seçilime uğradığını ve, dolayısıyla miRNA:mRNA etkileşiminde önemli role sahip olduğuna işaret eder (60). Korunmuşluk kriteri, TargetScan (58), miRanda (59), DIANA- microT (61), PITA (56) ve EIMMo (62) gibi algoritmalarda kullanılmaktadır.
- Diğer hedef diziler – miRNA'lar, mRNA'nın 3' UTR haricinde hem 5' UTR dizisinin hem kodlanan bölgeyi hedef alabileceği bilinmektedir (63-65). DIANA- microT (61), RNA22 (66), miRTar (67) ve TargetS (68) gibi algoritmalar bu diziler üzerinden de arama yapabilmektedir.

miRNA:mRNA çiftlerinin seçiminde, dizi komplementerliğini baz alan biyoinformatik öngörü araçlarına ek olarak ilgili hastalık/ doku tipine ait miRNA ve mRNA ekspresyon array verilerinin birarada değerlendirilmesi ile, özellikle söz konusu çalışma grubuna özgü güvenilir adayların seçimi sağlanabilir (69).

#### 1.4. Tez Kapsamı/ Amacı

Bu tez kapsamında, biyoinformatik analizler sonucu öne çıkan *miR-29* ailesi ve aday hedefi olan *TUBB2A* anlatımlarının validasyonu ve olası klinik önemleri araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında, çalışma grubumuzun ekspresyon array verileri ve açık veritabanından elde edilen miRNA ekspresyon array verileri birarada değerlendirilerek:

- Hasta/ Kontrol grupları arasında anlamlı değişime uğramış miRNA ve mRNA'ların belirlenmesi,
- Anlamlı değişime uğramış miRNA ve mRNA'ların öngörü ve deneysel verilere dayanan veritabanları baz alınarak eşleştirilmesi,
- Birlikte çalıştığı öngörülen miRNA:mRNA çiftlerinden T-ALL patogenezinde önemli olabilecek çiftlerin RT-PZR ile validasyonu,
- Elde edilen verilerin klinik bulgular ile karşılaştırılması hedeflenmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Örnekleri

Bu çalışmaya T-ALL tanısı almış ve kemik iliği blast yükü %90 ve üzerinde olan 54 hastanın tanı zamanı örnekleri dahil edilmiştir . On üç kız ve 41 erkekten oluşan çalışma grubumuzun ortalama yaşı 8.86 yıldır (Tablo 1).

**Tablo 1 T-ALL hastalarının klinik özellikleri (MSS: Merkezi sinir sistemi tutulumu)**

Sayı (n = 54)	
Yaş aralığı (yıl)	Ortalama 8.86 yaş Medyan 9 yaş
0-1 yaş	2
1-10 yaş	34
10-17 yaş	19
Cinsiyet	
Erkek	41
Kız	13
Beyaz kan hücre sayısı	Median 67 450 hücre/mcL
<50 000 hücre/mcL	13
>50 000 hücre/mcL	23
Bilinmeyen	19
Organ tutulumu	
MSS var	15
MSS yok	29
MSS bilinmeyen	6
Diğer organ tutulumu var	13
Diğer organ tutulumu yok	22
Diğer organ tutulumu bilinmeyen	9
33. gün tedavi yanıtı	
Var	32
Yok	8
Bilinmeyen	12
Relaps	
Var	13
Yok	30
Bilinmeyen	9
Son durum	
Sağ	32
Ex	13
Bilinmeyen	9

### 2.1.2. Kontrol Örnekleri

Çalışmamızda kontrol olarak açık kalp ameliyatı geçiren çocuklardan ameliyat artığı olarak çıkarılan timus dokularından elde edilen CD3+ ve CD3- T hücresi alt grupları (23.06.2011 tarih ve 183 sayılı İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu onayı ile) ve sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örneklerinden izole edilen CD3+ T hücreleri ve CD3- hücreleri kullanılmıştır.

### 2.1.3. Kimyasallar

Etidyum Bromür

Agaroz

İzopropanol

Etanol

PBS

Trizol

### 2.1.4. Kullanılan Kitler

SuperScript II

M-MLV

Mytenil MACS

### 2.1.5. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı ve Derin Dondurucular (+4°C, -20°C, -80°C)

Buz Makinası Cornelius

Otomatik Pipetler Eppendorf, ThermoScientific

PZR Cihazı (Thermo-Cycler) Bio-Rad T100

PZR Cihazı (Roche LightCycler 480)

Masaüstü Mini Santrifüj Beckman Coulter Microfuge 16

Soğutmalı Santrifüj

Laminer Akış Kabini NUAIRE

Nanodrop NanoDrop Technologies

Mikrodalga Fırın Arçelik

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Biyoinformatik analizler

Bu çalışmada grubumuzun daha önce oluşturmuş olduğu GSE46170 (mRNA, Hatırnaz Ng Ozden; 31 T-ALL ve 7 timosit subseti (70)) mRNA mikroarray verisi ve açık veritabanından elde edilmiş olan GS51908 (miRNA, Amol Carl Shetty; 13 T-ALL ve 12 T hücresi (71)) miRNA mikroarray verisi kullanılmıştır.

Aray verilerinin kalite kontrolü için affyAnalysisQC R paketi kullanılmıştır (72). Affymetrix platformundan elde edilmiş olan ham verilerin işlenmesinde (73) affy R paketi (74) kullanılarak RMA normalizasyonu (75) yapılmıştır. RLE (Görece Log anlatımı, *relative Log Expression*) ve NUSE (Normalize Ölçeksiz Standart Hata, *Normalized Unscaled Standard Error*) grafikleri kalite kontrolü değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

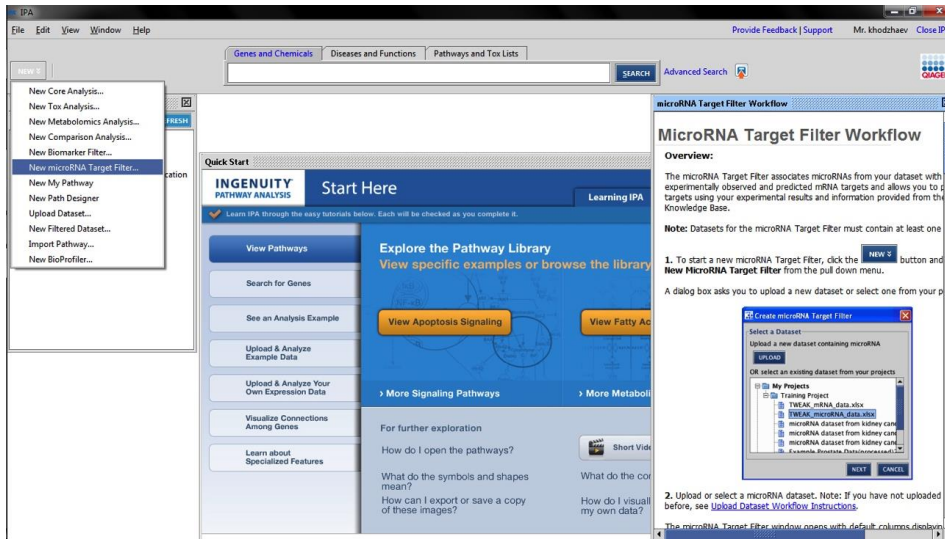
RLE grafiğinde görülen kutular, örneklerdeki (hasta/ kontrol) her probun değerlendirilen diğer örneklerdeki prob değerlerine oranını temsil etmektedir. Problemlerin çoğuna ait anlatım değerlerinin örnekler arası farklılık göstermeyeceği beklendiği için, dağılımın medyanı 0 civarında olmalıdır ve kutunun yüksekliği bütün örneklerde birbirine yakın olmalıdır. Bu iki kriterden sapma, teknik hatadan kaynaklı olabilir. NUSE grafiği ise, her örnekteki her proba ait anlatım değerlerinin standart hatalarının dağılımını vermektedir. Bu dağılımlar, örnekler arasında normalize edildiği için her örneğe ait medyanın 1 civarında olması beklenmektedir. Medyanların 1.05'in üstündeki değerleri, hassasiyette %5 düşüşü temsil etmektedir ve dolayısıyla analizden dışlanması önerilmektedir (72,76,77). Tüm örnekler her iki kriter açısından değerlendirildikten sonra ileri analizler devam ettirilmiştir.

Gruplar arası gen anlatımının kat değişimi ve anlamlılık *p* değerlerinin hesaplanması için, RMA normalizasyonu uygulanmış veriler, limma paketi (78) kullanılarak kat değişimi (FC, çıktı log2 cinsindedir), *p* ve düzeltilmiş *p* değerleri (*adj p*, Benjamini-Hochberg adjustment) hesaplanmıştır. mRNA arrayi için gen anlatımı değişiminin anlamlılık kriterleri olarak, FC 1'in üstünde ve -1'in altında kalan değerler, *adj p* 0.05 ve daha küçük değerler seçilmiştir. Ayrıca, listeden, affimetrix platformuna özgü kontrol problemleri ve gen bilgisi bulunmayan problemler çıkartılmıştır.

miRNA-hedef belirlenmesinde, deneysel verilerin desteklediği "MirTarBase" ve "DIANA tools" veritabanları kullanılmıştır. Öngörü araçlarının belirlediği miRNA-

hedef çiftlerine ulaşmak için ise “TargetScan”, “microRNA.org”, “miRDB” ve “miRWalk” veritabanları kullanılmıştır.

miRNA:mRNA verilerinin birleştirilmesi amacıyla Ingenuity Pathway Analysis (IPA) programından faydalanılmıştır (Şekil 3). Normalizasyon sonrası filtre edilen mRNA ve miRNA mikroarray verileri IPA programına bir arada yüklenerek olası miRNA:mRNA çiftleri biraraya getirildikten sonra, anlatım açısından ters yönde korelasyon gösteren çiftler belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 3: IPA programının ön yüzü

microRNA dataset: miR	Symbol	Fold Change	Source	Confidence	Expression Pairing	mRNA dataset: mRNA	ID	Symbol	Fold Change	Pathway
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	miRNA	P2834		+2.834	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	miRNA	+1.749		-1.749	Epithelial Adherens Junction Signaling, Fac
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human, miRDB	Experimentally Observed, High (predicted)	↑	mRNA	+2.774		-2.774	EP2 Signaling, Regulation of eIF4 and p70S6
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+1.525		-1.525	Axonal Guidance Signaling, Breast Cancer R
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	Moderate (predicted)	↑	mRNA	+1.824		-1.824	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+1.623		-1.623	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+2.575		-2.575	Calcium Signaling, Calcium Transport I
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+1.554		-1.554	NF2-mediated Oxidative Stress Response
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+3.027		-3.027	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+1.931		-1.931	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+2.442		-2.442	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+2.262	C2orf88	+2.262	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+1.736	CBL	+1.736	4-3-3-mediated Signaling, Clathrin-mediat
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+1.948	CCNY	+1.948	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+2.024	CDC34	+2.024	Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signal
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+12.799	CEBPD	+12.799	Adipogenesis pathway, IL-17A Signaling in F
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	High (predicted)	↑	mRNA	+2.031	CEP164	+2.031	
hsa-let-7g_st	let-7a-5p (and other miRNAs)	-1.711	TargetScan Human	Moderate (predicted)	↑	mRNA	+2.884	CFLAR	+2.884	Death Receptor Signaling, Molecular Mecha

Şekil 4: IPA programında anlatımı ters korelasyon gösteren miRNA:mRNA çiftlerini gösteren pencere



## 2.2.2. Kullanılan Veritabanları

Kullanılan veritabanları ve ilgili açıklamaları Tablo 2'deki gibidir.

**Tablo 2: Kullanılan veritabanları**

Veritabanı	Açıklama
NCBI, <b>Annotation Release 108</b> , <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Referans dizileri ve genom bilgilerini içerir
GEO, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo</a>	NCBI veritabanı altında, kullanıma açık olan array ve dizilemeye dayalı verileri içerir
ArrayExpress, <a href="http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/">http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/</a>	Kullanıma açık olan yüksek çıktılı verileri içerir
UCSC, <b>Release hg38</b> , <a href="https://genome.ucsc.edu/">https://genome.ucsc.edu/</a>	Referans dizileri ve genom bilgilerini içerir
DAVID, <a href="https://david.ncifcrf.gov/">https://david.ncifcrf.gov/</a>	Fonksiyonel anotasyon ve yolak analizlerinde kullanılan araçları içermektedir
Biology WorkBench <a href="http://workbench.sdsc.edu/">http://workbench.sdsc.edu/</a>	Dizi korunmuşluğu analiz araçlarını içerir
Mirbase, <b>Release 21</b> , <a href="http://www.mirbase.org/">http://www.mirbase.org/</a>	microRNA referans dizilerini ve genomik koordinatlarını içeren veritabanı
miRTarBase, <b>Release 6.0</b> , <a href="http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/">http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/</a>	Deneysel verilerle destekli miRNA – hedef etkileşimlerine dair bilgilerin saklandığı veritabanı
DIANA Tools, <b>TarBase v7.0</b> , <a href="http://diana.imis.athena-">http://diana.imis.athena-</a>	Deneysel verilerle destekli miRNA – hedef etkileşimlerine dair bilgilerin

<i>innovation.gr/DianaTools/</i>	saklandığı veritabanı
miRWalk, <b>miRWalk 2.0</b> , <a href="http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/">http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/</a>	Deneysel verilerle ve öngörü araçlarının tahmin ettiği miRNA-hedef etkileşimlerine dair verileri içerir
PRECOC, <a href="https://precog.stanford.edu/index.php">https://precog.stanford.edu/index.php</a>	Mikroarray verilerinin analizi ile gen anlatımı değişimlerinin sağkalım üzerindeki etkisinin analizi için kullanılan veritabanı

### 2.2.3. Kullanılan Analiz Programları

Kullanılan analiz programları ve ilgili açıklamaları Tablo 3'teki gibidir.

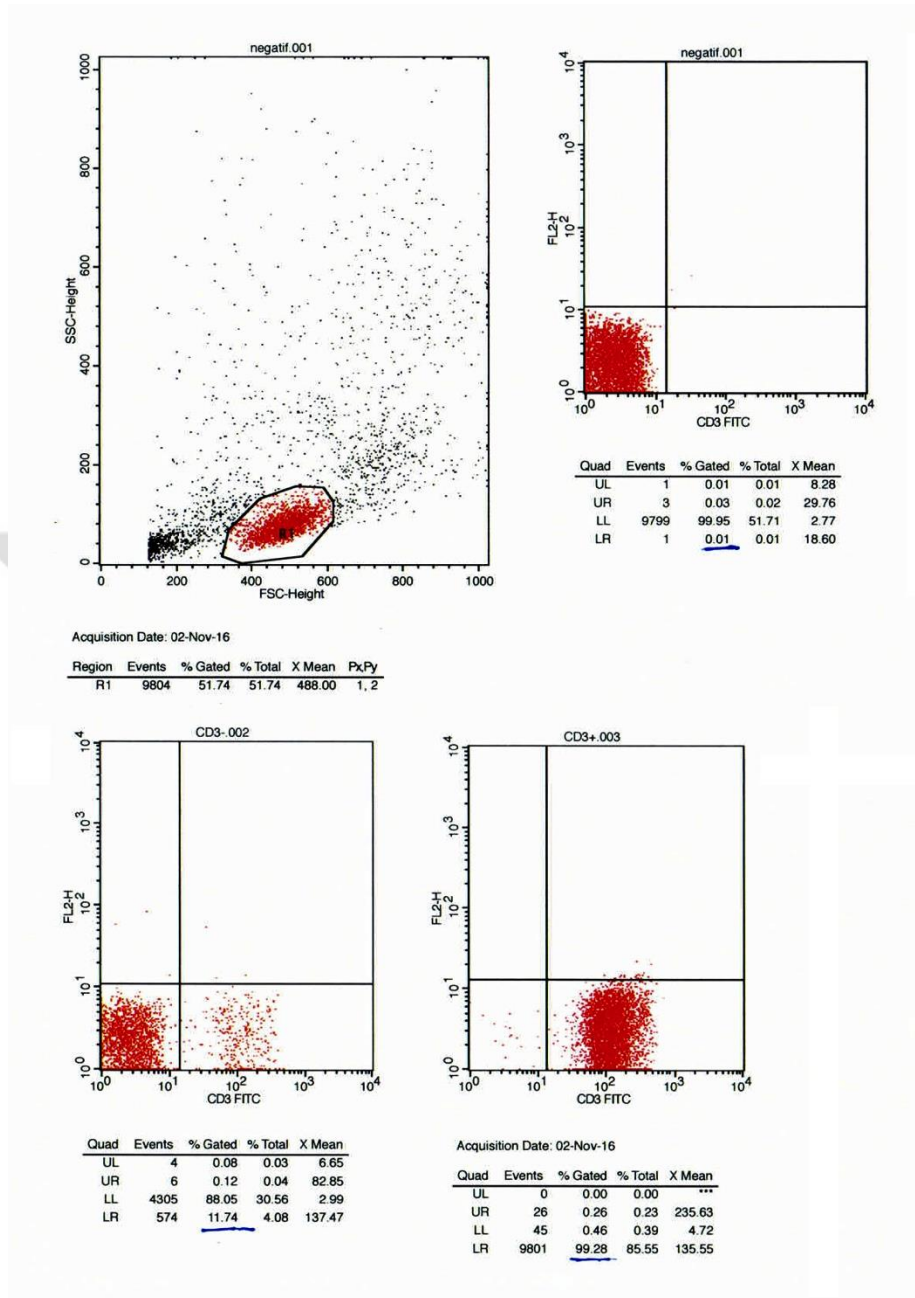
**Tablo 3: Kullanılan analiz programları**

Program adı	Açıklama
R Project, <a href="https://www.r-project.org/">https://www.r-project.org/</a>	Grafik oluşturulmasında ve istatistiksel analizlerde kullanılan arayüz
Bioconductor, <a href="http://www.bioconductor.org/">http://www.bioconductor.org/</a>	R tabanlı biyoinformatik kaynak
Python, <a href="https://www.python.org/">https://www.python.org/</a>	Programlama dili
GraphPad, <a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a>	İstatistiksel analiz ve grafik oluşturmak için kullanılan yazılım
SPSS, <a href="http://www-03.ibm.com/software/products/tr/spss-statistics">http://www-03.ibm.com/software/products/tr/spss-statistics</a>	İstatistiksel analiz ve grafik oluşturmak için kullanılan yazılım
IPA (Ingenuity Pathway Analysis), <a href="https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/">https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/</a>	Yüksek çıktılı veri analizi yazılımı

#### **2.2.4. Lökosit İzolasyonu**

#### **2.2.5. Manyetik Boncuklar ile CD3+ Hücrelerin Ayırıştırılması**

Kontrol hücresi olarak kullanılmak amacıyla hem periferik kandan hem de daha önce homojenize edilerek sıvı azotta dondurulmuş timus dokusundan CD3+ hücrelerin çekilmesi amacıyla manyetik boncuklar kullanılmıştır. Bu amaçla fikol ile ayırıştırılan mononükleer hücreler PBS ile yıkanır. Ardından %0.5 BSA ve 2mM EDTA içeren PBS içine aktarılır. Hücreler soğukta tutulmalıdır. Her  $10^7$  hücre başına 20ul CD3 manyetik boncuğu gelecek şekilde hücreler işaretlenir ve 15 dakika soğukta bekletilir. Hücreler tekrar yıkandıktan sonra  $10^8$  hücre başına 500ul tampon çözelti eklenir. Aynı zamanda manyetik boncukları tutacak filtreli tüpler manyetik alana yerleştirilir ve 3 ml tampon çözelti ile yıkanır. Hücre süspansiyonu filtreye aktarılır ve işaretlememiş hücreler filtrenin altında bir tüpte toplanır. Filtre tampon çözelti ile üç kez yıkandıktan sonra filtre temiz bir tüp ile birleştirilir ve manyetik alandan uzaklaştırılır. Beş ml tampon çözelti eklenerek hızla filtrenin yıkanması sağlanır, bu sayede CD3 işaretli hücreler elde edilmiş olur. Hücrelerin saflığının belirlenmesi amacıyla bir miktar hücre süspansiyonu ayrılarak, CD3 antikoru ile işaretlenir ve akım sitometrisinde analiz edilir. Elde edilen hücre saflığının %95'in üzerinde olması beklenmektedir (Şekil 5).



Şekil 5: FACS ile hücre popülasyonu saflığı tayini

### 2.2.6. Trizol ile RNA İzolasyonu

Trizol içine alınmış lökositler, 37 C'de 10 dakika bekletildi. 1 ml trizol başına 200 ul soğuk kloroform eklendikten sonra iyice vortekslendi. 10500 rpm'de 15 dakika +8 C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası iki faz oluştu ve üst faz yeni tüpe alınarak,tekrar 200 ul kloroform eklenerek 10500 rpm'de 8 C'de 10 dakika santrifüj edildi. Tekrar üst faz yeni tüpe aktarıldı ve 500 ul soğuk %100 etanol eklendikten sonra -20 C dolaba 30 dakikalığına kaldırıldı. Daha sonra, 10500 rpm 8 C'de 10 dakika

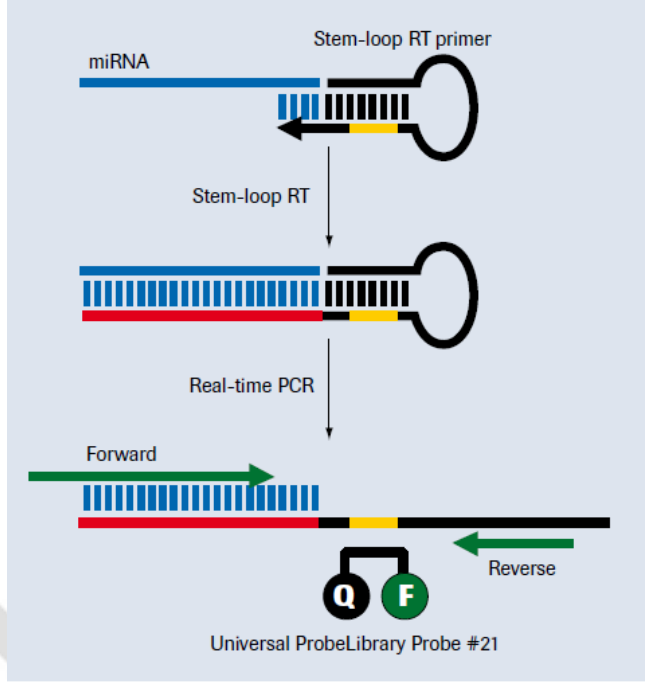
santrifüj edildi.üst faz atıldıktan sonra 1 ml %75 etanol eklendi ve 7500 rpm 8 C’de 5 dakika santrifüj edilerek RNA çöktürüldü. Üst faz atıldıktan sonra kısa süre 37 C’de RNA’nın kuruması için bekletildi. RNA pelleti “Rnase free” distile suda çözündürüldü.

### 2.2.7. Stem loop cDNA sentezi

miRNA RT-PZR için kullanılan cDNA bileşenleri ve cDNA sentezi prtokolü Tablo 4’teki gibidir.

**Tablo 4: Stem-loop cDNA sentezi protokolü**

RNA, 7 ul içinde 1000 ng RNA olacak şekilde sulandırıldı
1 ul dNTP (10 mM)
1 ul mi-29a stem-loop primeri (2 pmol)
1 ul mi-29b stem-loop primeri (2 pmol)
1 ul SNORD24 stem-loop primeri (2 pmol)
65 C’de 5 dakika inkübasyon
1 ul 5x First Strand Buffer
2 ul DTT (0.1 M)
1 ul RnaseOUT ( 40 U/ul)
42 C’de 2 dakika inkübasyon
1 ul SuperScript II RT enzimi (200U)
42 C’de 50 dakika
70C’de 15 dakika



**Şekil 6: Stem-loop cDNA sentezinin prensibi**

miRNA kantitasyonunda, işi aşamalı protokol izlenmiştir. İlk aşamada, stem-loop (saç tokası) şeklindeki primerler – ana yapısındaki dizi sabit olmakla beraber, 3’ ucunda söz konusu miRNA’ya özgü 6 nukleotidlik sizi içermektedir – kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 6). İkinci aşamada ise, kırmızı ile gösterilmiş olan miRNA’dan sentezlenmiş olan miRNA dizisine özgü ileri primer ve sabit saç tokası dizisine bağlanan evrensel primer kullanılarak eş zamanlı kantitatif PZR (qRT-PZR) yapılmıştır. Ayrıca, sabit dizide UPL #21 nolu probun bağlanabileceği diziyi içermektedir. Dolayısıyla, ROCHE kitinin kullanıldığı protokol ile miRNA kantitasyonu yapılabilmektedir (22).

### 2.2.8. Random hegzamer ile cDNA sentezi

**Tablo 5: Random hegzamer ile cDNA sentezi protokolü**

RNA, <b>10 ul</b> içinde 1000 ng RNA olacak şekilde sulandırıldı
<b>1 ul</b> dNTP (10 mM)
<b>1 ul</b> random hegzamer (25 mM)
65 C'de 5 dakika inkübasyon
<b>1 ul</b> 5x First Strand Buffer
<b>2 ul</b> DTT (0.1 M)
<b>1 ul</b> RnaseOUT ( 40 U/ul)
37 C'de 2 dakika inkübasyon
1 ul M-MLV RT enzimi (200U)
25 C'de 10 dakika
37 C'de 50 dakika
70 C'de 15 dakika

### 2.2.9. qPZR

Kantitatif PZR için kullanılan qPZR karışımı Tablo 6'daki gibidir. miRNA ve mRNA'lar için kullanılan primer ve ilgili UPL prob listesi Tablo 7'deki gibidir.

**Tablo 6: qPZR karışım içeriği**

İçerik	Konsantrasyon	Miktar
Master Mix	2X	5 µl
Forward Primer	10 pmol	0.5 µl
Reverse Primer	10 pmol	0.5 µl
Prob #1/78/21/48	10 uM	0.2 µl
PZR Grade dH <sub>2</sub> O	-	1.8 µl
Toplam Miktar	-	8 µl
cDNA		2 ul

**Tablo 7: qPZR'da kullanılan primer ve prob lar listesi**

Primer adı	Primer dizisi/ UPL prob (5'→3')
<i>MİR-29a</i> F	GCGGTTAGCACCAT C TGAAAT
<i>MİR-29b</i> F	CGCCAATAGCACCAT T TGAAATC
<i>MİR-29c</i> F	GGCCGTAGCACCAT T TGAAAT
<i>MİR-28-5p</i> F	CGCTAAGGAGCTCACAGTCT
Universal miR R	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>SNORD24</i> F	TGCGGTGCAGATGATGTAAAA
<i>SNORD24</i> R	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC
<i>TUBB2A</i> F	CGACCCACAGGCAGTTA
<i>TUBB2A</i> R	GGATGGCCCGAGGTACATA
<i>PPIA</i> F	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG
<i>PPIA</i> R	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC
<i>BACH2</i> F	AATGATAAAGCCAGAAGAAAGCAT
<i>BACH2</i> R	CATGTCACAGTGCGAGGAAG
miRNA UPL prob	#21
<i>TUBB2A</i> UPL prob	#78
<i>PPIA</i> UPL prob	#48
<i>BACH2</i> UPL prob	#1

qPZR deneylerinde ROCHE LighCycler 480 cihazı kullanılmıştır. Rölatif gen anlatımı hesaplamalarında, mRNA için referans gen olarak *PPIA* ve miRNA için *SNORD24* geni kullanılmıştır.  $2^{(\text{referans } C_p - \text{Hedef } C_p)} \times 100$  formülü kullanılarak, hedef genin referans gene göre yüzde anlatımı değerleri elde edilmiştir.



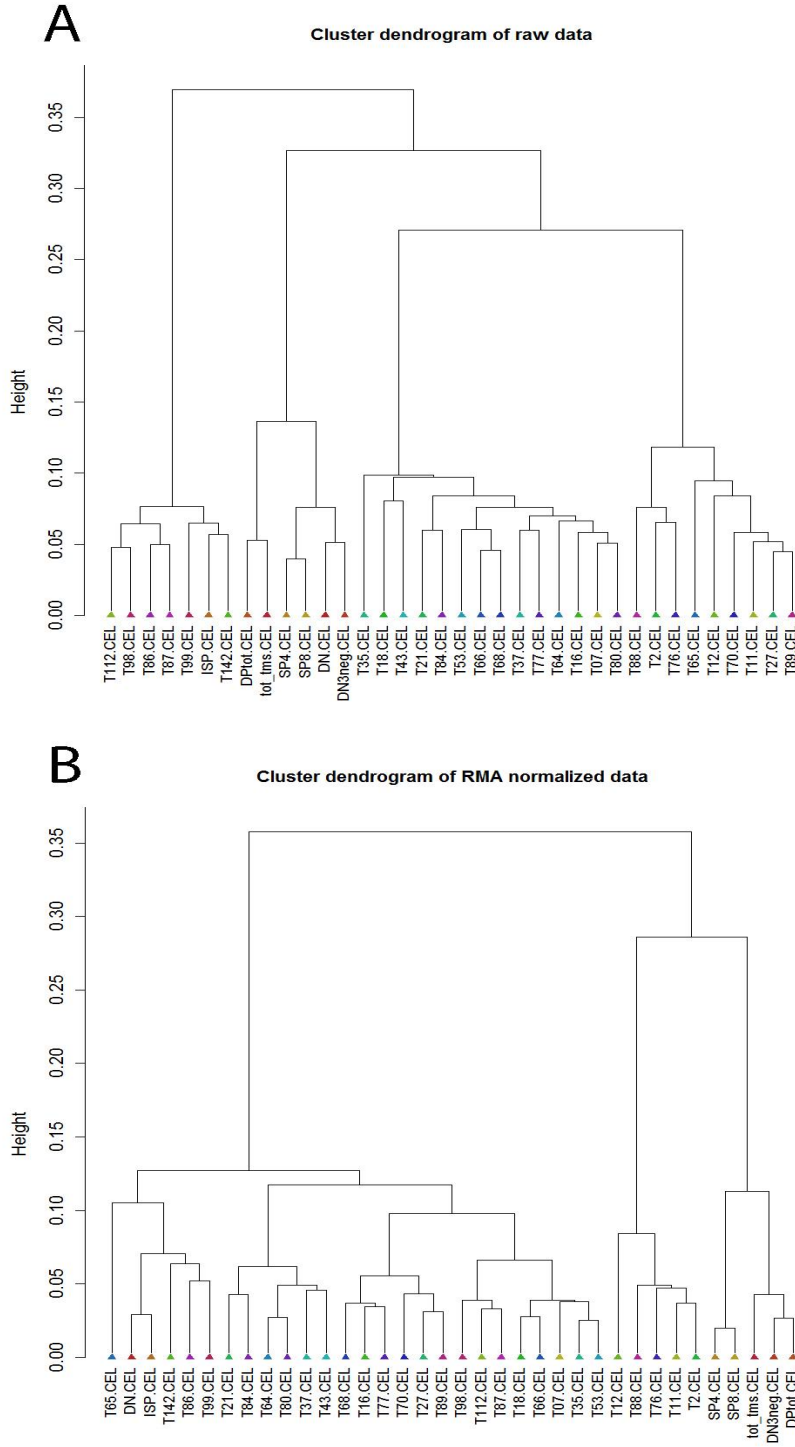
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Verilerin işlenmesi

##### 3.1.1. Kalite kontrolü

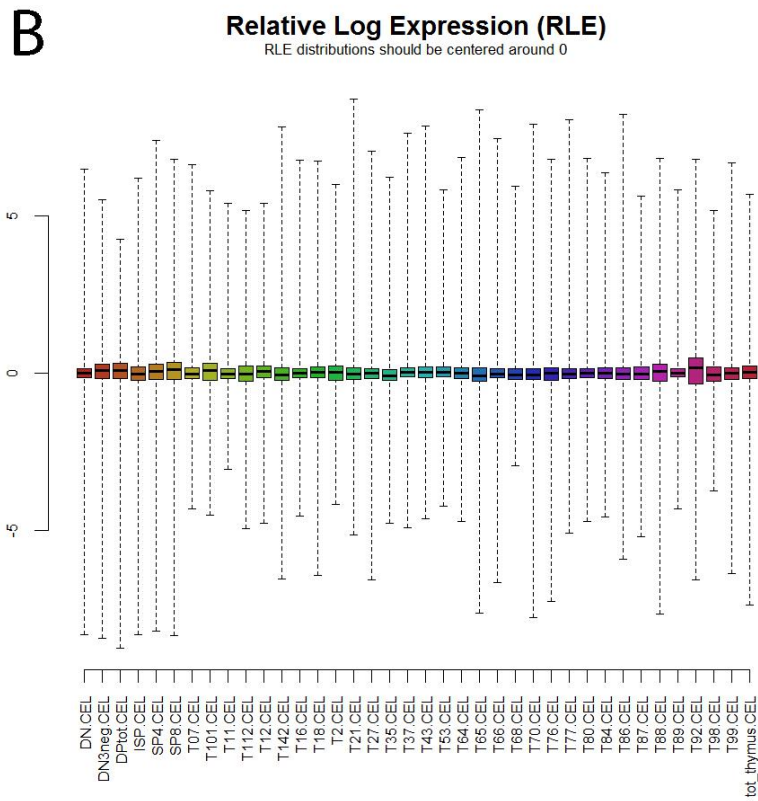
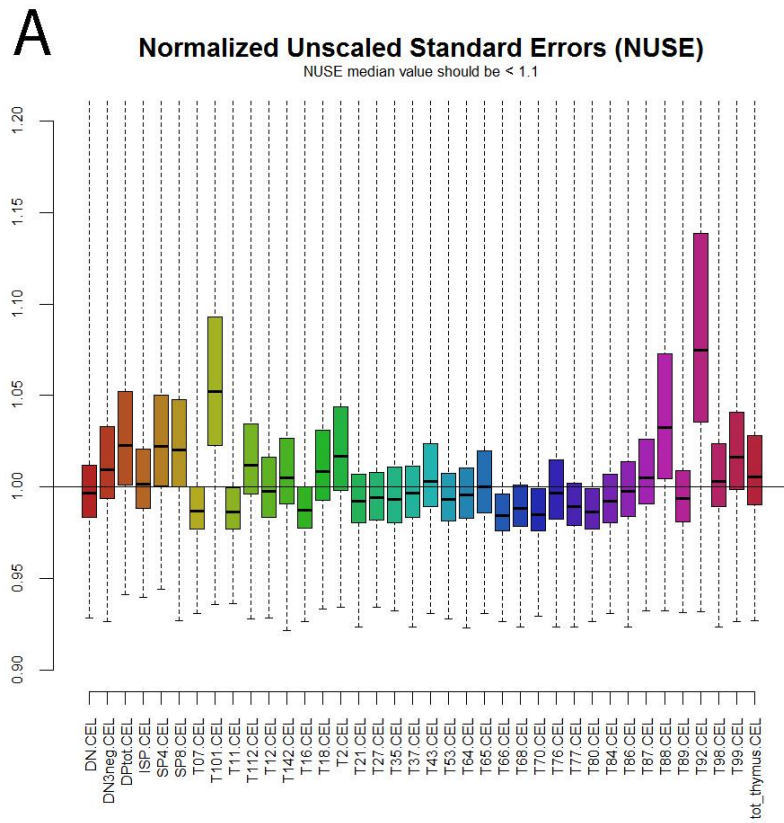
Ekspresyon array gibi yüksek çıktılı verilerin gen anlatım kat değişimi ve istatistiksel anlamlılık testi gibi analizlerine başlamadan önce, ham verinin kalite kontrolü ve ardından örneklerin karşılaştırılabilir hale getirilmeleri için veriler normalize edilmelidir. Verilerin işlenmemiş ve RMA normalizasyonu sonrası halindeki kontrol ve hasta örneklerinin kümelenme şekillerini değerlendirmek için dendogram grafikleri çizilmiştir (Şekil 7A ve 7B). Dendogramda görüldüğü üzere, örneklerin normalizasyonu öncesi bile, hasta ve kontrol örneklerinin (ISP, immatür single pozitif hariç) birbirine yakın gruplar şeklinde kümelenmeye eğilimli olduğu görülmektedir. Dikkati çeken örnekler T101 ve T92'dir. Bu örneklerin diğer gruplara göre mesafesi oldukça uzaktır ve tek başlarına gözükmektedir. RMA normalizasyonu sonrası ise, diğer kontrollerden farklı olarak, ISP ve DN (double pozitif) kendi içinde grup oluşturmaktadır.

Kalite kontrolü değerlendirilmesinde RLE (Görece Log anlatımı, “*relative Log Expression*”) ve NUSE (Normalize Ölçeksiz Standart Hata, “*Normalized Unscaled Standard Error*”) grafikleri kullanılmıştır. RLE grafiğinde T92 örneğindeki median diğer örneklerle göre daha yüksek ve değerlerin dağılımının daha geniş olduğu görülmektedir (Şekil 8A). NUSE grafiklerinde ise hem T92 hem de T101 normal değerlerin dışında gözlenmiş ve bu nedenle her iki örnek de ileri analizlerden dışlanmıştır (Şekil 8B).



**Şekil 7:** T-ALL hastalarında mikro dizi gen anlatımı (mRNA) analizlerinin kümelendirme verileri.

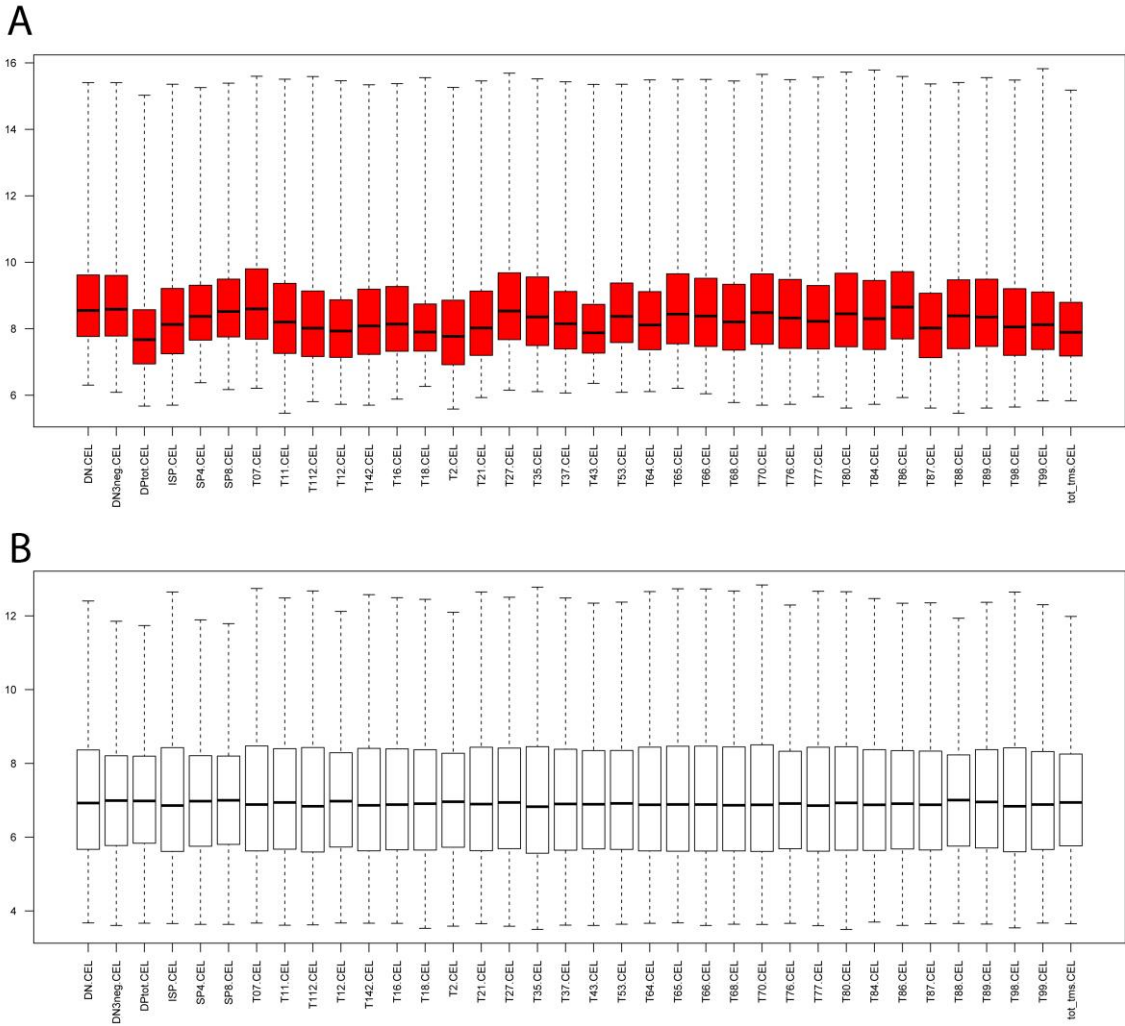
**A.** Ham gen anlatım verileri ile gerçekleştirilen kümelendirme ağacı, **B.** Normalize edilmiş veriler ile gerçekleştirilen kümelendirme ağacı. T kodları T-ALL hastalarını belirtir. DN: Double Negatif (Çift Negatif), ISP; Immature Single Pozitif (Olgunlaşmamış tek pozitif), SP4; Single Positive 4 (Tek pozitif 4), SP8; single positive 8 (Tek pozitif 8), tot\_tms; total timus dokusu, DN3neg (Çift negatif 3), DP tot; total çift pozitif.



**Şekil 8:** Örneklerin kalite kontrol değerlendirmesi **A.** NUSE grafiği, **B.** RLE grafiği

### 3.1.2. Normalizasyon

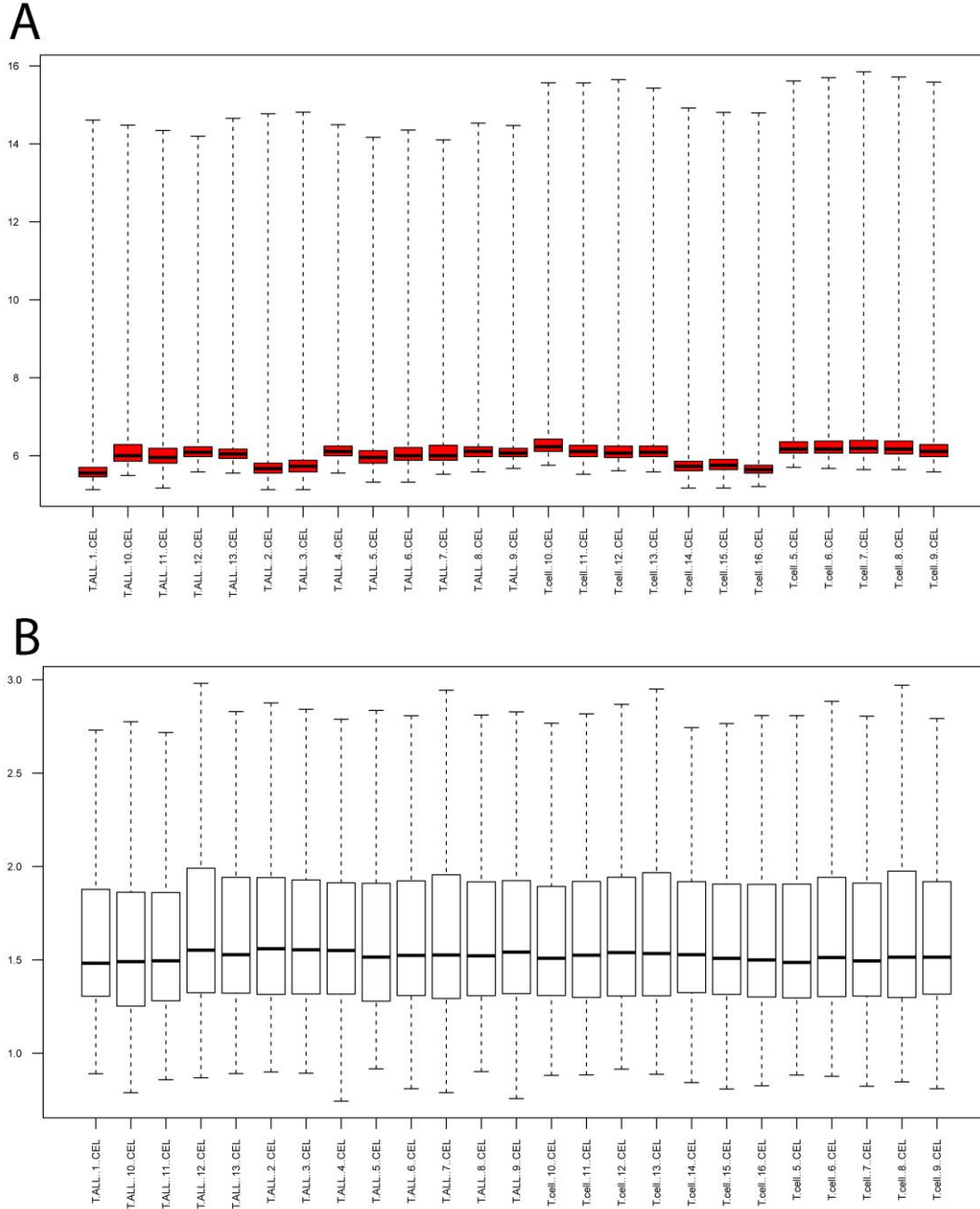
Kalite kontrolü sonrası, ham verinin normalizasyonu için RMA (Robust Multiarray Average (74)) normalizasyonu uygulanmıştır. Normalizasyon öncesi hasta ve kontrol örneklerinin medyan değerleri birbirinden farklı bir şekilde dağılım göstermektedir (Şekil 9A). Ancak RMA normalizasyonu sonrası tüm örneklerin medyan değerleri ortak bir bölgeye yerleşmiş ve karşılaştırılabilir hale gelmiştir (Şekil 9B)



**Şekil 9:** T-ALL mikro dizi gen anlatım (mRNA) verilerinin

**A.** normalizasyon öncesi ve **B.** sonrası box plot grafikleri. Her iki grafikte de prob değerlerinin medyanı ve dağılımı görülmektedir (n = 36)

Yine benzer şekilde miRNA gen anlatım verileri de ileri analizlerde kullanılabilir olması için RMA normalizasyonuna tabii tutulmuştur. Burada da normalizasyonu takiben örnek medyan değerlerinin yakınlığı gözlenmektedir (Şekil 10A ve 10B).



**Şekil 10:** T-ALL örneklerinde miRNA gen anlatım array değerlerinin

**A.** Normalizasyon öncesi ve **B.** Normalizasyon sonrası box plot dağılımları gösterilmektedir (n = 25). T-ALL ön adları hastaları, T-cell ön adları ise kontrol hücrelerini belirtmektedir.

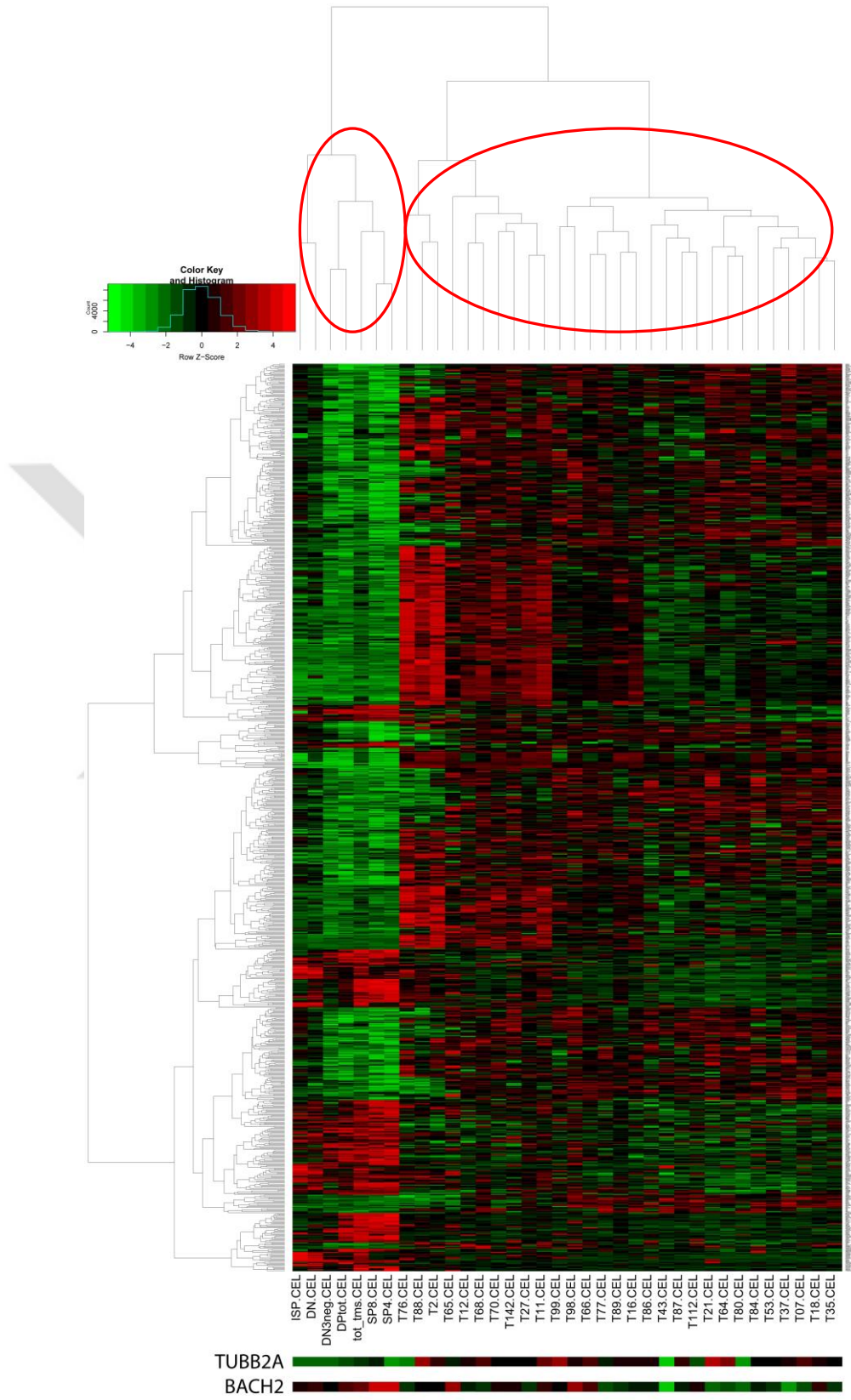
### 3.1.3. Gen anlatım değişimi analizi

Gruplar arası gen anlatımının kat değişimi ve anlamlılık  $p$  değerlerinin hesaplanması için, normalizasyon sonrası kat değişimi),  $p$  ve düzeltilmiş  $p$  değerleri hesaplanmıştır. Filtreleme kriterlerini takiben T-ALL mikro dizi gen anlatım array platformunda bulunan toplam 54 675 probdan geriye, 687 gene denk düşen 891 prob kalmıştır.

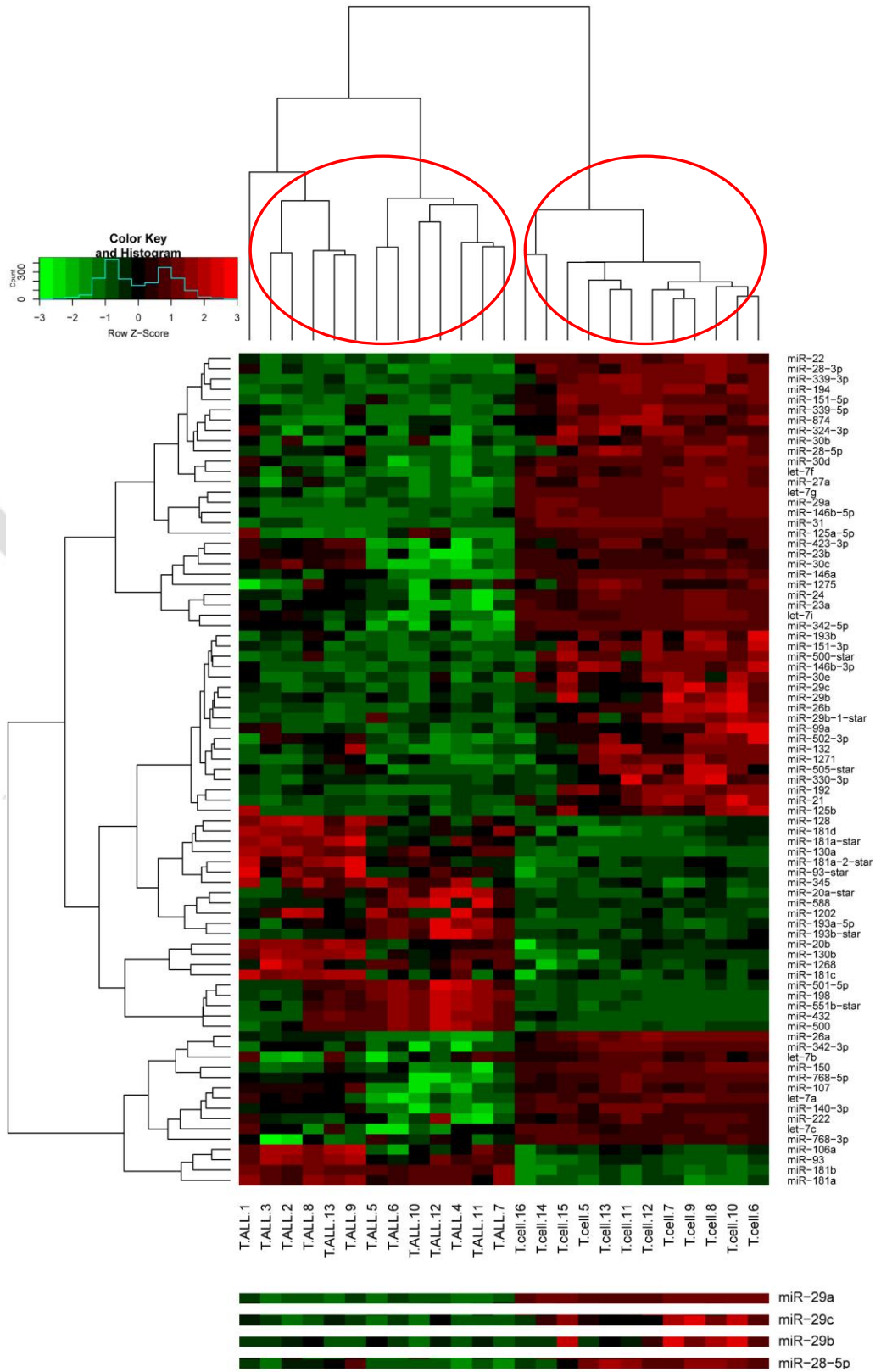
İlgili 687 genin DAVID veritabanında yolak zenginleştirmesi analizlerinde, kanserde transkripsiyonel regülasyonun bozulması (19 gen,  $p = 1.2 \times 10^{-4}$ ), kemokin sinyal yolakları (18 gen,  $p = 2 \times 10^{-3}$ ), NOD-benzeri reseptör yolağı (8 gen,  $p = 5.9 \times 10^{-3}$ ), kanser yolakları (26 gen,  $p = 1.4 \times 10^{-2}$ ), hematopoetik hücre hatları (9 gen,  $p = 0.02$ ), TNF sinyal yolağı (10 gen,  $p = 0.025$ ), MAPK sinyal yolağı (18 gen,  $p = 0.026$ ), hücre adezyon molekülleri (12 gen,  $p = 0.026$ ), lökositlerin transendotel göçü (10 gen,  $p = 0.046$ ), Toll-benzeri reseptör yolağı (9 gen,  $p = 0.061$ ) ve JAK-STAT yolağı (11 gen,  $p = 0.064$ ) öne çıkmaktadır (Ham veriler, Ek Tablo 10).

Kat değişimi yüksek ( $\log_{2}FC \geq 1$ ,  $adj\ p = 0.05$ ) olan 891 proba ait ısı haritasında görüldüğü gibi (Şekil 11), kontrol grubu ( $n = 7$ ) ve T-ALL hastalarına ait örneklerin iki büyük grup şekilde kümelendiği görülmektedir (ısı haritası üzerindeki dendogramda görüldüğü gibi).

miRNA verisinin normalizasyonu sonrası, kat değişimi 2 kat artmış veya azalmış ve  $p$  değeri 0.05'ten küçük olan miRNA'lara özgü filtreleme yapıldıktan sonra, toplam 847 miRNA'dan geriye 81 adet miRNA kalmıştır. Isı haritasında görüldüğü gibi, T-ALL ve normal T hücresi örnekleri iki ayrı kolda gruplanmaktadır (Şekil 12).



**Şekil 11: T-ALL mRNA mikroarray anlatımında filtreleme sonrası elde edilen 891 proba ait ısı haritası.**



**Şekil 12: miRNA mikroarray anlatımına ait ısı haritası**

(kat değişimi 2 olan ve düzeltilmiş p değeri 0.05'ten küçük olan miRNA'lar, n = 81)



### 3.1.4. Veri entegrasyonu

Açık veritabanından elde edilen miRNA mikroarray verisi (GSE51908) normalizasyon ve filtrele sonrası toplam 81 (prob) miRNA'ya ait anlatım değerleri elde edilmiştir. Çalışma ekibimiz tarafından oluşturulan T-ALL mRNA gen anlatım analizlerinde ise normalizasyon ve filtreleme sonucu 891 prob değerleri elde edilmiştir. Bu iki liste IPA yazılımına yüklendikten sonra, yazılımda mevcut olan bütün miRNA:mRNA bilgilerine ait veritabanları kullanılarak miRNA ve ilgili mRNA hedeflerinin eşleştirilmesi sağlanmıştır. Bu listede bulunan miRNA:mRNA çiftlerinden sadece ters yönde değişim gösteren çiftlere özgü filtreleme yapıldığında toplam 52 adet miRNA:mRNA çiftinden oluşan liste elde edilmiştir (Tablo 8)

**Tablo 8: Birbirleri ile ters yönde anlatım değişikliği gösteren miRNA:mRNA.**

Toplan 52 miRNA:mRNA çiftini içeren liste. Gri bölgeler miRNA, turuncu bölgeler mRNA hedef genleri göstermektedir. Log FC – 2 tabanlı logaritmik kat değişimi, negatif değerler genlatımında düşüşü göstermektedir.

miRNA	logFC	logFC	Hedef	miRNA	logFC	logFC	Hedef
hsa-let-7g	-1.711	2.774	AGO4	hsa-miR-424	-1.419	2.381	E2F3
hsa-let-7g	-1.711	15.910	TLR4	hsa-miR-424	-1.419	1.822	FGFR1
hsa-miR-613	1.365	-1.630	EGFR	hsa-miR-424	-1.419	3.297	H3F3A
hsa-miR-613	1.365	-3.343	HSPA1A	hsa-miR-424	-1.419	4.106	TPM3
hsa-miR-122	-1.087	1.543	ADAM17	hsa-miR-424	-1.419	17.961	VEGFA
hsa-miR-122	-1.087	3.216	MECP2	hsa-miR-424	-1.419	1.973	VTI1B
hsa-miR-506	1.189	-1.321	TRIM29	hsa-miR-20b	1.432	-1.970	TP63
hsa-miR-125a-5p	1.398	-2.323	ERBB3	hsa-miR-18a	1.306	-1.970	TP63
hsa-miR-125a-5p	1.398	-4.868	ID3	hsa-miR-205	1.170	-2.323	ERBB3
hsa-miR-125a-5p	1.398	-1.702	IGFBP3	hsa-miR-208b	-1.355	27.757	CD14
hsa-miR-132	-3.582	3.216	MECP2	hsa-miR-21	-4.485	3.389	TPM1
hsa-miR-132	-3.582	30.026	MMP9	hsa-miR-210	1.034	-1.749	ACVR1B
hsa-miR-133b	-1.125	17.051	KCNH2	hsa-miR-214	-1.663	186.543	GPD1
hsa-miR-133b	-1.125	1.888	RB1CC1	hsa-miR-22	-1.875	2.960	PPARA
hsa-miR-140-5p	-1.178	17.961	VEGFA	hsa-miR-221	1.080	-3.527	FOS
hsa-miR-145	-1.019	1.681	EIF4EBP2	hsa-miR-27a	-1.664	1.574	FBXW7
hsa-miR-145	-1.019	5.612	KLF5	hsa-miR-302e	1.659	-1.970	TP63
hsa-miR-145	-1.019	4.106	TPM3	hsa-miR-371-5p	-1.249	15.060	MGST1
hsa-miR-146b-5p	-1.997	118.931	CAMP	hsa-miR-371-5p	-1.249	30.026	MMP9
hsa-miR-146b-5p	-1.997	1.935	CCR3	hsa-miR-29a	-2.800	3.863	INSIG1
hsa-miR-146b-5p	-1.997	19.322	NFIX	hsa-miR-29a	-2.800	8.475	TUBB2A
hsa-miR-146b-5p	-1.997	15.910	TLR4	hsa-miR-30b	-1.558	2.226	PRPF40A
hsa-miR-150	-1.535	4.478	CEBPB	hsa-miR-34a	3.301	-1.661	MYCN
hsa-miR-150	-1.535	17.961	VEGFA	hsa-miR-519e-star	-1.082	5.640	FGFR2
hsa-miR-155	1.111	-2.409	SOCS1	hsa-miR-520g	-1.443	17.961	VEGFA
hsa-miR-424	-1.419	3.906	ARHGDI1A	hsa-miR-802	-1.342	3.216	MECP2

IPA yazılımında bulunan hastalık, doku veya yolak spesifik filtreleme seçeneklerinden lösemilerde önemli olabilecek yolak elemanlarına özgü filtreleme yapıldığında *miR-29:TUBB2A* çifti elde edilmiştir. Bu bulgu, doğrulama amacıyla toplam 12 algoritmanın verilerini birarada analiz eden miRWalk veritabanında incelenmiş ve *miR-29* ailesinin her üç üyesinin de *TUBB2A*'yı hedef alabileceği 9 öngörü aracı tarafından tahmin edilmiştir (Tablo 9).

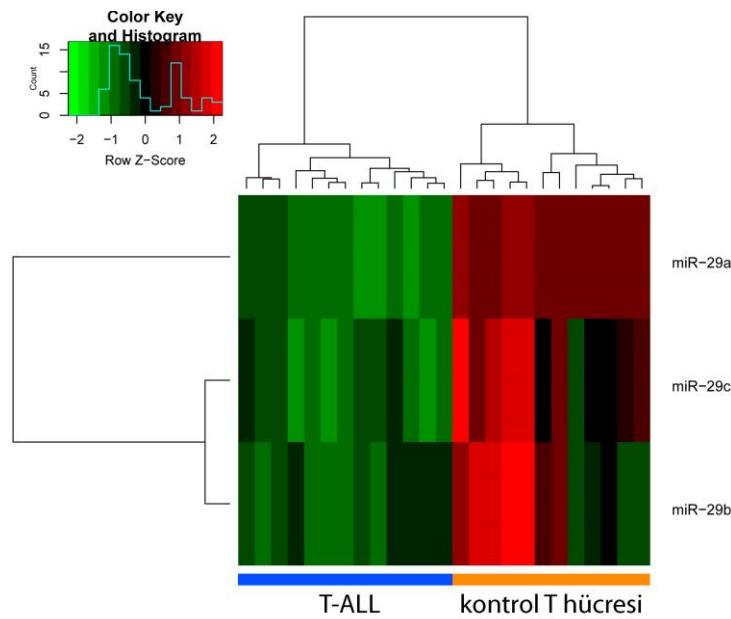
**Tablo 9: miRWalk veri tabanı çıktısı.**

hsa-mir-29 ailesinin her üç üyesi (a, b ve c) de *TUBB2A* genini hedefler şekilde gözlenmiştir. 1: ilişki var, 0: ilişki yok

Gene	miRNA	miRWalk	Microt4	miRanda	mirbridge	miRDB	miRMap	miRMAP	Pictar2	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan	SUM
TUBB2A	hsa-miR-29a-3p	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	9
TUBB2A	hsa-miR-29b-3p	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	9
TUBB2A	hsa-miR-29c-3p	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	9

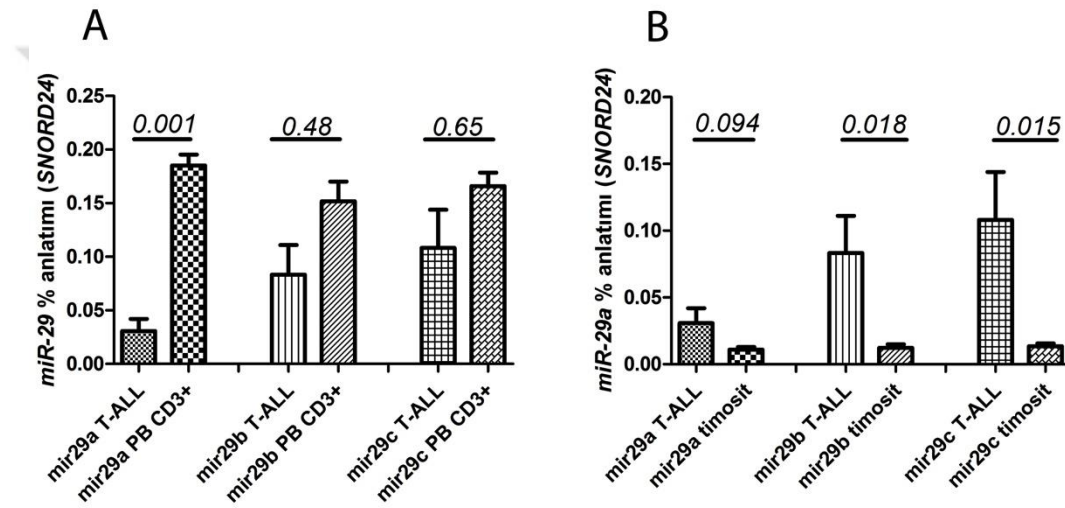
### 3.2. miR-29 Ailesi Gen Anlatımı Bulguları

mir-29 aile üyelerinin mikroarray verisindeki anlatım seviyeleri incelendiğinde, her üç mir-29 (mir-29a  $adj p = 1.7 \times 10^{-19}$ , mir-29b  $adj p = 0.003$ , mir-29c  $adj p = 4.4 \times 10^{-5}$ ) üyesinin de T-ALL hastalarında, periferik kan kökenli sağlıklı T hücrelerine göre anlatımının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 13).



**Şekil 13: miR-29 ailesi ısı haritası**

miRNA array verilerinde elde edilen bulguların doğrulanması amacıyla *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* anlatım seviyeleri qRT-PZR ile çalışılmıştır. T-ALL hastaları sağlıklı periferik T hücreleri (PB CD3+) ile karşılaştırıldığında, mikroarray bulgularıyla tutarlı olarak mir-29 ailesi üyelerinin hastalarda düşük olduğu ancak sadece *mir-29a* bulgularının istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p=0.001$ ) tespit edilmiştir (Şekil 14A). Fakat, mir-29 aile üyelerinin T-ALL'deki anlatım seviyeleri timustan izole edilen CD3+ timositlerdeki anlatım seviyeleriyle mukayese edildiğinde, hastalardaki anlatım seviyelerinin kontrollerden yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 14B).

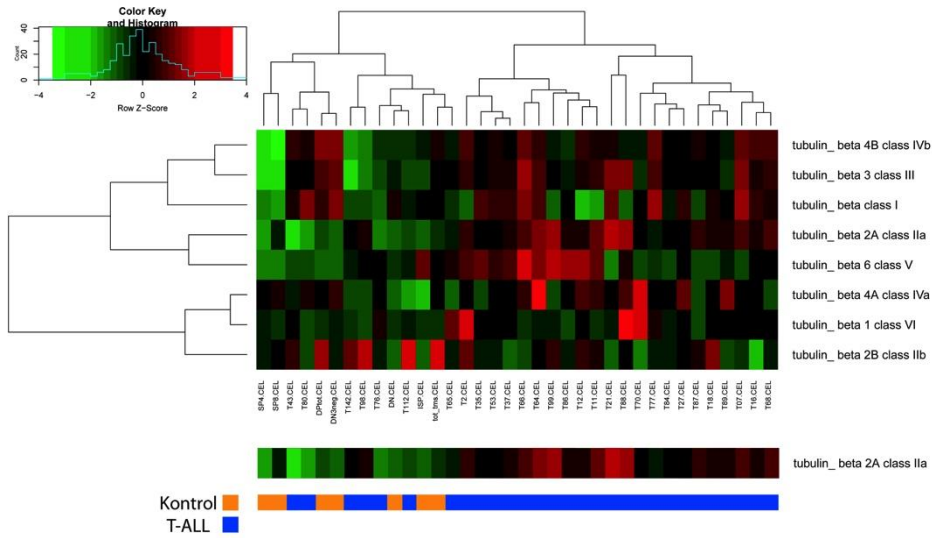


**Şekil 14: miR-29 ailesi gen anlatımı bulguları**

**A** T-ALL ve periferik T hücresi. **B** T-ALL ve sağlıklı timosit hücreleri. Housekeeping gen olarak *SNORD24* kullanılmıştır

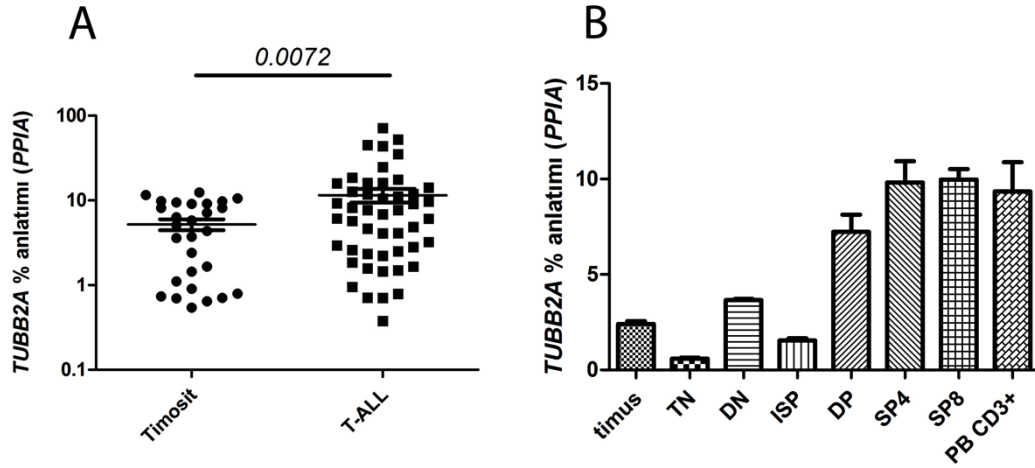
### 3.3. *TUBB2A* Gen Anlatımı Bulguları

*TUBB2A* geninin yanı sıra tubulin B diğer izotiplere ait mikroarray verisindeki anlatım seviyeleri incelendiğinde, sadece *TUBB2A* geninin T-ALL ve sağlıklı timosit örnekleri arasında anlamlı gen anlatım değişimi ( $\text{adj } p = 0.01$ ,  $\text{logFC} = 2.5$ ) gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 15)



Şekil 15: TUBB isotiplerinin mikroarraydeki anlatımının ısı haritası

*TUBB2A* geninin anlatım seviyesi T-ALL hastalarında ve sağlıklı timosit örneklerinde qPZR ile validasyon çalışmasında, *TUBB2A* anlatım seviyesinin mikroarray verileriyle tutarlı olarak, T-ALL hastalarında yüksek anlatım gösterdiği belirlenmiştir ( $p = 0.0072$ , Şekil 16A). Ayrıca sağlıklı timositler T hücre gelişim evrelerine göre incelendiğinde, olgunlaşmanın ilerledikçe *TUBB2A* anlatımının yükseldiği tespit edilmiştir (Şekil 16B).



Şekil 16: *TUBB2A* relatif gen anlatımı düzeyleri

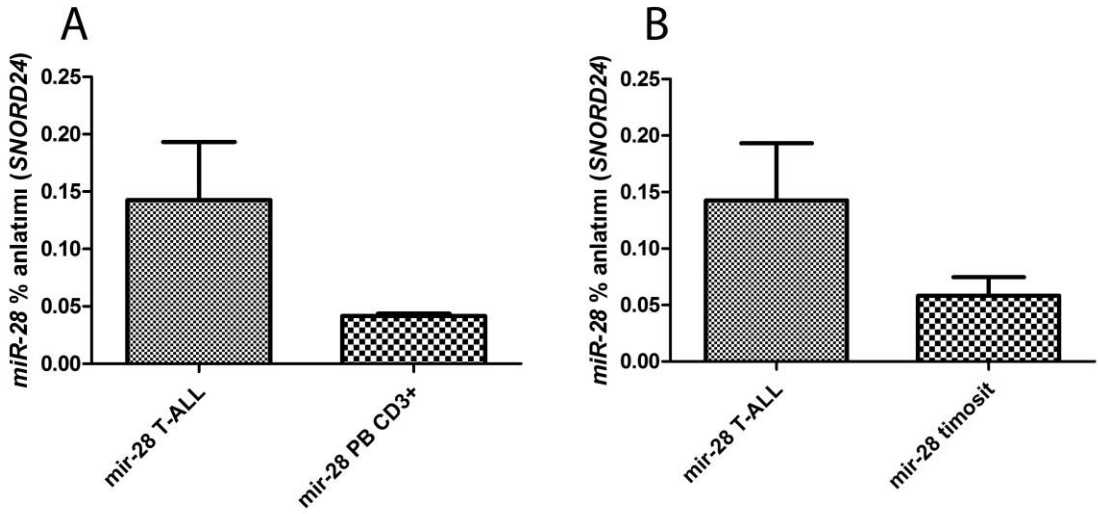
A. Pediatrik T-ALL ve kontrol örneklerine ait *TUBB2A* anlatım değerleri (y eksenini  $\log_{10}$  cinsinden verilmiştir). B. T hücresi gelişim evrelerine ait timositlerin *TUBB2A* anlatımı (y eksenini lineer değerleri göstermekte). Housekeeping gen olarak *PPIA* kullanılmıştır.

*TUBB2A* verileri mikroarray bulguları ile örtüşürken, mir-29a verileri kontrol örneği olarak timosit kullanıldığında miRNA mikroarray bulgularından farklılık göstermiştir. Bu nedenle daha önceki analizlerde T-ALL hastalarında anlamlı azalış gösteren *mir-28* ve *mir-29a*'nın hedeflediği *BACH2* genleri de valide edilmiştir.

### 3.4. miR-28 ve BACH 2 Bulguları

*TUBB2A*'yı hedef alabileceği tahmin edilen mir-28-5p, mikroarray verisindeki T-ALL hastalarında normal T hücrelerine göre düşük anlatımı olduğu gözlenmiştir (logFC =-2.5, Şekil 11).

qPZR sonuçlarında mikroarray bulgularının aksine, mir-28-5p'nin anlatımının T-ALL hastalarında sağlıklı T hücrelerine göre yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p = 0.064$ ) (Şekil 17A). Ayrıca, hastalardaki mir-28-5p anlatımının timosit hücrelerine göre de istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber yüksek anlatım yaptığı görülmüştür ( $p = 0.13$ ) (Şekil 17B).



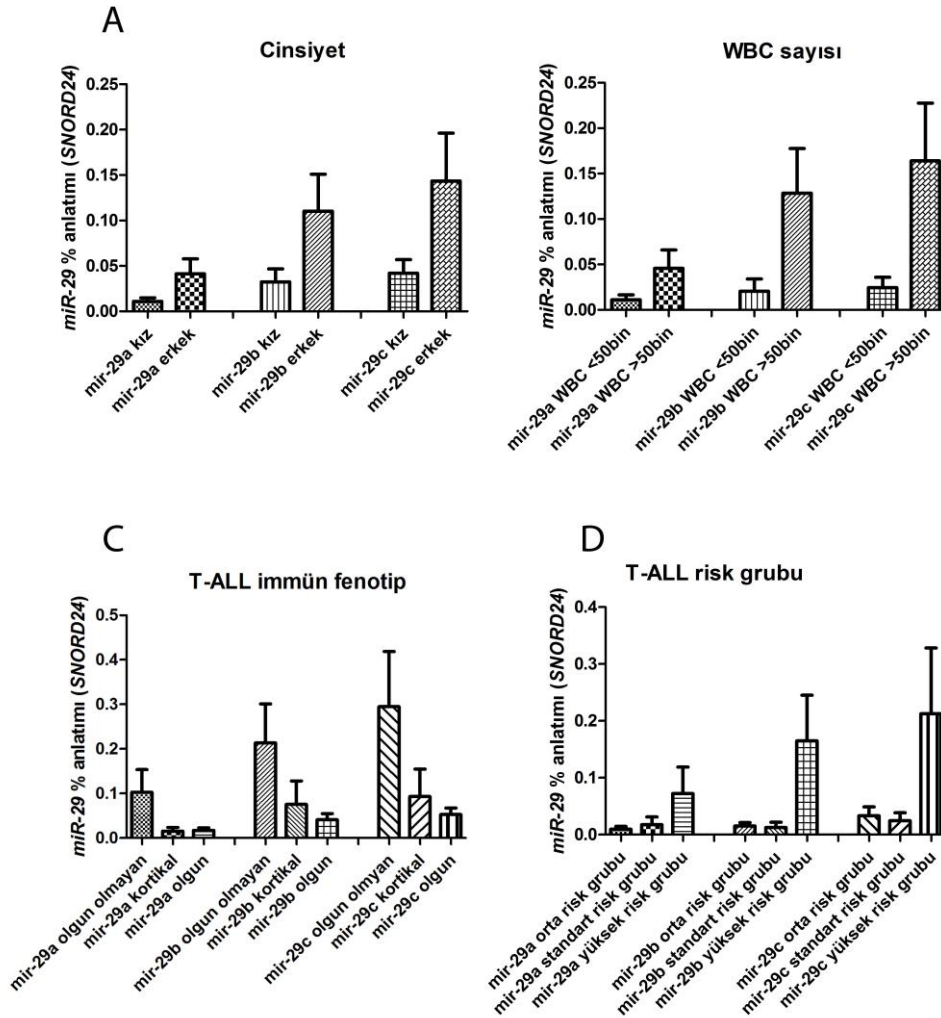
Şekil 17: A T-ALL ve priderik T hücresi. B T-ALL ve sağlıklı timosit hücreleri

Housekeeping gen olarak *SNORD24* kullanılmıştır

miR-29 ailesinin öngörülen hedeflerinden ve transkripsiyon faktörü olan *BACH2* geninin mikroarraydeki anlatımının, T-ALL ve sağlıklı timositlerdeki anlatımının karşılaştırılmasında ise, T-ALL'deki anlatımının azaldığı görülmüştür (logFC =-2.2, Şekil 11), fakat qPZR çalışmalarında çok geç Cp değerlerinin elde edilmesi nedeniyle, *BACH2* geninin anlatım seviyesi valide edilememiştir.

### 3.5. Mir-29 ailesi Gen Anlatımı ve Klinik Korelasyon Analizleri

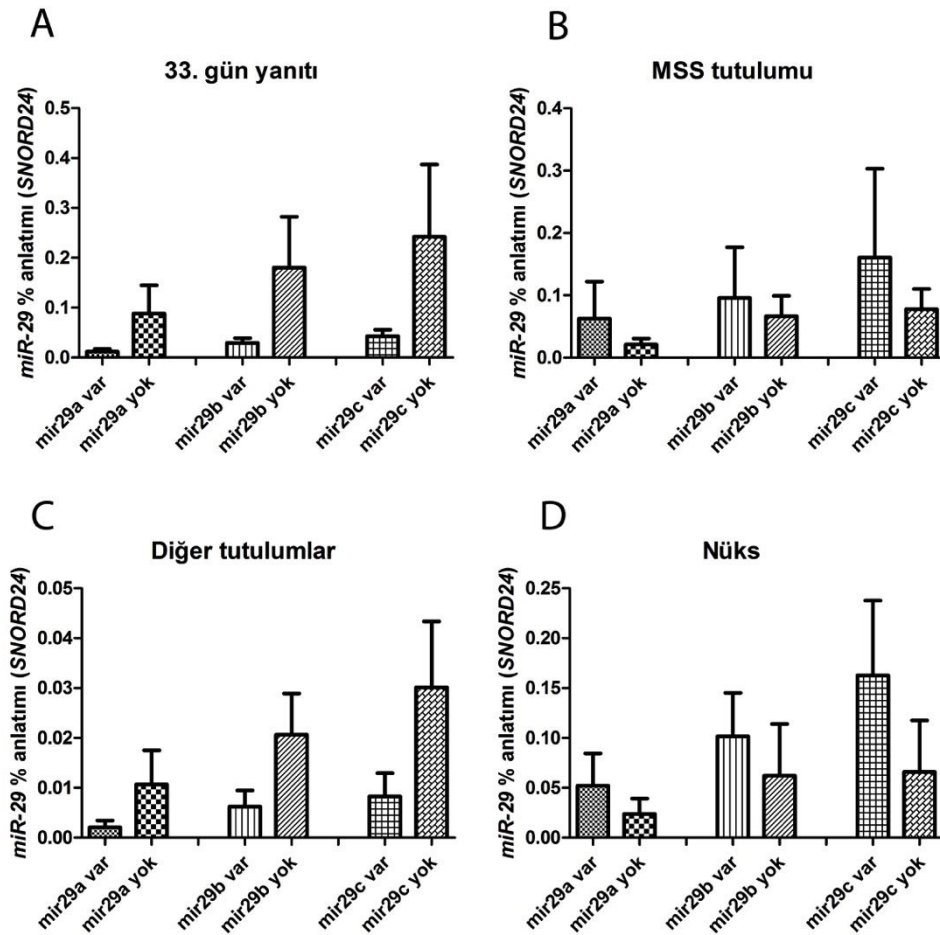
mir-29 ailesi gen anlatım düzeyleri klinik bulgular ile karşılaştırıldığında, WBC sayıları 50bin ve üzeri olan hastalarda her üç mir-29 üyesi oldukça yüksek anlatım göstermektedir, sayı yetersizliği nedeniyle istatistiksel olarak p değeri anlamlı değildir (mir-29a  $p = 0.13$ , mir-29b  $p = 0.06$ , mir-29c  $p = 0.054$ ) (Şekil 18B). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, miR-29a, b ve c erken evre hastalarında daha yüksek anlatım gösterirken, olgun hastalarda anlatım düzeyi düşmektedir (Şekil 18C). Risk gruplarındaki anlatım düzeyleri incelendiğinde ise mir-29 ailesinin her üç üyesinin de yüksek risk grubundaki hastalarda daha yüksek anlatıma girdiği gözlenmiştir, fakat istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir (Şekil 18D).



Şekil 18: mir-29 ailesi üyeleri gen anlatımlarının klinik bulgularla olan ilişkileri.

Housekeeping gen olarak *SNORD24* kullanılmıştır

Mir-29 ailesi anlatımının tedavi başarısı üzerine etkileri incelendiğinde ise, tedavi başlangıcından sonraki 33. gündeki tedavi yanıtına göre ayrılan gruplarda, tedaviye yanıtı olmayan hastalarda miR-29 üyelerinin her üçünün de anlatımının yüksek olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 19A). Hastalardaki merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu açısından incelendiğinde ise, tutulumun olduğu grupta miR-29 ailesinin anlatımının, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, daha yüksek anlatım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 19B). MSS tutulumu dışındaki organ tutulumları açısından incelendiğinde ise, diğer organ tutulumlarının gözlenmediği hastalarda miR-29 üyelerinin daha yüksek anlatım yaptıkları görülmektedir (Şekil 19C). Ayrıca, miR-29 üyelerinin, hastalığın ileride nüks edip etmemesiyle olan ilişkisi incelendiğinde, nüks edecek hasta grubunun bu aile üyelerindeki anlatım seviyelerinin, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, daha yüksek anlatıma sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 19D).



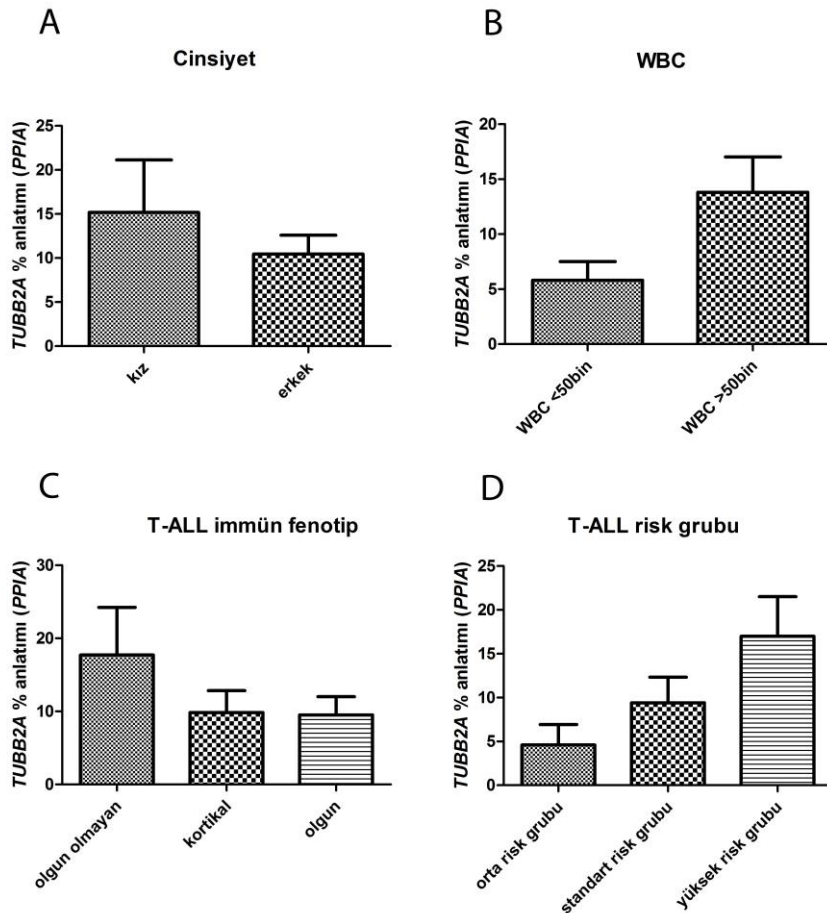
Şekil 19: miR-29 ailesi üyeleri anlatımı ve klinik bulgularla olan ilişkileri.

Housekeeping gen olarak *SNORD24* kullanılmıştır

Mir-29 analizleri gerçekleştirilen hastalarda sağ kalım verileri sınırlı sayıda olduğu için istatistiksel analizler uygulanamamıştır.

### 3.6. *TUBB2A* Geni Anlatımı ve Klinik Korelasyon Analizleri

WBC düzeyi 50bin üzerinde olan hastalarda *TUBB2A* anlatımı daha yüksek olarak bulunmuştur ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p=0.035$ , Şekil 20B). İstatistiksel olarak anlamlılık göstermese de erken evre hastalarında ve yüksek risk grubunda *TUBB2A* anlatımları artmış olarak bulunmuştur (olgun olmayan ve kortikal  $p = 0.22$ , olgun olmayan ve olgun  $p = 0.26$ ) (Şekil 20C). Benzer şekilde, yüksek risk grubu hastalarında, diğer gruplara göre daha yüksek *TUBB2A* anlatımının olduğu bulunmuştur (orta risk grubu ve yüksek risk grubu  $p = 0.023$ , standart risk grubu ve yüksek risk grubu  $p = 0.24$ ) (Şekil 20D).

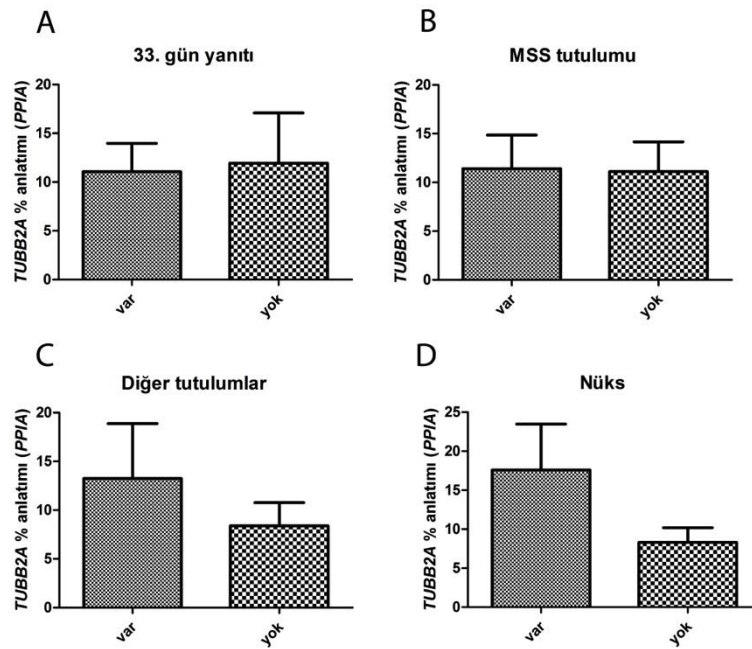


Şekil 20: *TUBB2A* anlatımı ve klinik bulgularla olan ilişkisi

Housekeeping gen olarak *PPIA* kullanılmıştır



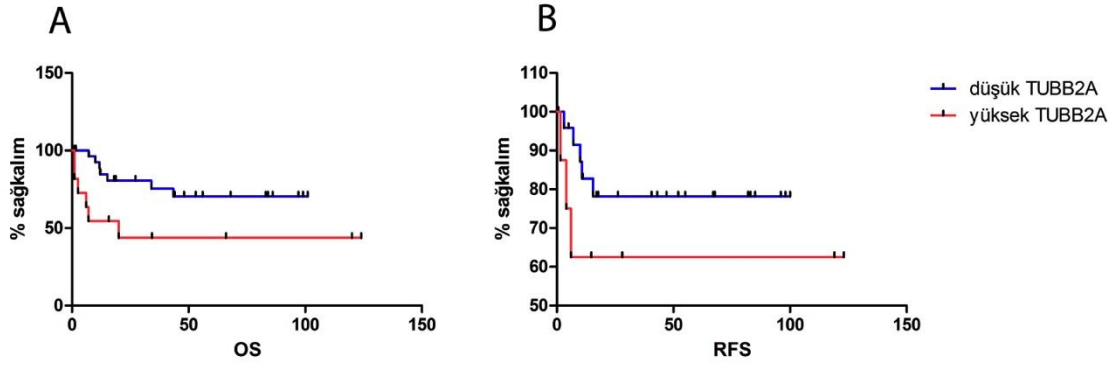
*TUBB2A* anlatım seviyeleri ve hastaların klinik özellikleri arasındaki olası ilişkilerin araştırılmasında, 33. günde tedaviye yanıtı ve MSS tutulumunun olması gibi klinik özelliklere göre ayrılan gruplar arasında bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 21A ve 21B). MSS dışındaki organlarda tutulumu olan hastalarda, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber, *TUBB2A*'nın anlatımının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p = 0.4$ ) (Şekil 21C). İleride nüks geçirecek hastalarda da, *TUBB2A* anlatımının daha yüksek anlatım yapma eğiliminde olduğu, fakat istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $p = 0.16$ ) (Şekil 21D).



**Şekil 21: *TUBB2A* anlatımı ve klinik bulgularla olan ilişkisi.**

Housekeeping gen olarak *PPIA* kullanılmıştır

*TUBB2A*'nın, hastalarının genel sağkalımı (OS, overall survival) ve hastalısız sağkalımı (RFS, relapse free survival) üzerindeki etkisinin incelendiği sağkalım analizleri sonuçlarına göre, *TUBB2A* anlatımı yüksek olan hastalardaki sağkalımın (log rank  $p = 0.033$ ) ve hastalısız sağkalımın ( $p = 0.19$ ) daha kısa olduğu bulunmuştur (Şekil 22A ve 22B).

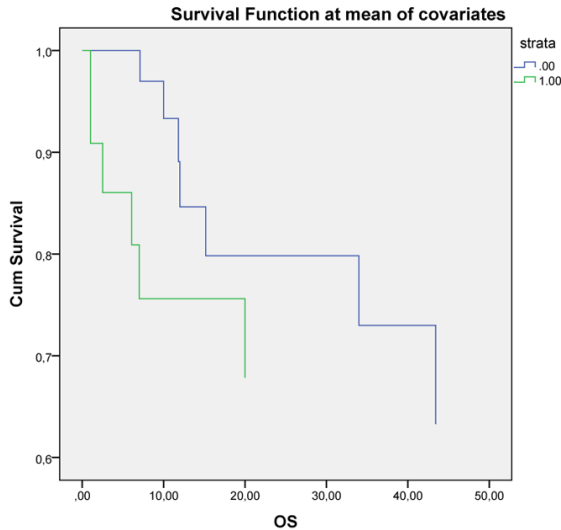


**Şekil 22 Sağkalm analizi.**

*TUBB2A* anlatımı ortalamasına göre hastalar yüksek ve düşük anlatımlı olmak üzere iki gruba ayrıldıktan sonra **A.** Genel sağ kalım ve **B.** Hastalıksız sağ kalım olasılık analizleri gerçekleştirilmiştir

Cox regresyon analizlerinde ise *TUBB2A* anlatımı yüksek ve tedavi yanıtı olmayan hastalarda sağ kalım değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ( $p=0.008$ , Şekil 23). Aynı zamanda *TUBB2A* anlatımı yüksek ve relaps gözlenen hastalarda da sağ kalım oranları düşmektedir ancak istatistiki anlamlılık sınırda kalmıştır ( $p=0.06$ ).

Variables in the Equation						
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)
relapse	1,135	,611	3,453	1	,063	3,111
response	1,623	,608	7,133	1	,008	5,070



**Şekil 233: Cox regresyon analizi**

#### 4. TARTIŞMA

Gelişmekte olan timositlerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimler sonucu T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) veya T hücreli lenfoblastik lenfoma gelişebilmektedir ve bu hastalıklar Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırılmasında lösemi/lenfoma başlığı altında gruplanmaktadır (79). T-ALL patogenezi, kromozomal yapı anomalileri, translokasyonlar, füzyon genler, delesyon, insersiyon, gen mutasyonları ve epigenetik değişimlerle ilişkilendirilmiştir (80). Genetik ve epigenetik iki ayrı mekanizmayı temsil etse de, ikisinin birlikte yarattığı etki önem arz etmektedir, çünkü epigenetik mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar, epigenetik regülasyondan sorumlu genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir. Huether ve arkadaşlarının (81) yaptığı çalışmada, pediatrik T-ALL hastalarının %50'sinde epigenetik mekanizmalardan sorumlu genlerde mutasyonlar saptanmıştır. Dolayısıyla, T-ALL epigenetik bozukluklarla yakından ilişkili bir hastalık türüdür.

DNA metilsasyonu ve histon modifikasyonlarının yanı sıra, gen anlatımı regülasyonundan sorumlu bir diğer epigenetik mekanizma da miRNA'lar aracılığıdır ve bu küçük moleküller hem onkogen hem tümör baskılayıcı olarak davranabilmektedir (82,83). Örneğin, onkogen gibi davranan *mir-19b*, *miR-20a*, *miR-26s*, *miR-92*, *miR-128-5p* ve *miR-223*, *BIM*, *IKZF1*, *FBXW7*, *PHF6* ve *PTEN* gibi T-ALL patogenezinin önemli olan tümör süpresör genlerinin anlatımını baskılayabilmektedir (83,84).

Bu çalışmada çocukluk çağı T-ALL hastalığının patogenezinde rol oynayan miRNA'ların, T-ALL gen anlatım verileri ile karşılaştırılarak ortaya çıkartılması hedeflenmiştir. Bu amaçla daha önce gerçekleştirdiğimiz T-ALL mikroarray çalışması ile açık veri tabanlarından elde ettiğimiz T-ALL miRNA mikroarray verileri birlikte analiz edilerek aday miRNA:RNA çiftleri belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda ön plana çıkan çiftlerden bir tanesi *mir-29a:TUBB2A* olmuştur. *miR-29* ailesinin hedeflerinden biri olan *TUBB2A* geni, hücre iskeletinin yapıtaşlarından olan tubulin izotipidir. *TUBB2A*'nın *miR-29* ailesi hedefi olabileceği, “seed” bölgelerinin incelenmesine dayanılarak birçok tahmin aracı ile öngörülmüştür. Hem miRTarBase veritabanında hem de IPA analizlerimizde bu iki genin ters korelasyonda anlatım yaptıkları gösterilmiştir. Daha önce yapılan iki farklı miRNA çalışması analizlerinde de *mir-29a*'nın *TUBB2A* genini hedeflediği bildirilmiş ancak bu veriler valide edilmemiştir (88,89), Bu çalışma *mir-29a:TUBB2A* ilişkisinin inceleyen ilk çalışma olma

özelliğindedir. *TUBB2A*'nın, yapısına katıldığı mikrotübülün hücre bölünmesi, hücre çoğalması, hücre hareketiyle yakından ilgili olması ve birçok anti-mitotik kemoterapi ajanının hedefi olması nedeniyle analizlerimizde öne çıkan *miR-29* ve *TUBB2A* çiftinin olası ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan mikroarray verisinin validasyonu çalışmasında, *miR-29* ailesinin her üç üyesinin de anlatımı, *miRNA* mikroarray verileri ile doğru orantılı olarak, T-ALL hastalarında sağlıklı periferik T hücrelerine göre, özellikle *miR-29a*'nın düşük olduğu tespit edilmiştir. Fakat, T-ALL'nin timustan köken alan timositlerin gelişimindeki süreçlerin bozulması ile ortaya çıkması ve T-ALL hastalarının T hücre gelişim evrelerine göre sınıflandırılması nedeniyle, T-ALL çalışmalarında sağlıklı kontrol olarak timosit dokusundan elde edilmiş T hücresi alt populasyonlarının kullanılması daha doğrudur. Bu nedenle validasyon çalışmasında kontrol grubu olarak sağlıklı timosit alt grupları kullanıldığımızda, T-ALL hastalarında *miR-29*'un her üç üyesinin de anlatımının sağlıklı timositlere göre yüksek olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, seçtiğimiz çiftin, doğru kontroller ile valide ettiğimizde, anlatımının ters yönde değil, aynı yönde oluğu görüldüğünden, *miR-29* ve *TUBB2A* bulguları ayrı ayrı tartışılmıştır.

Tubulin izotipleri, hücre iskeletini oluşturan mikrotübüllerin yapıtaşlarıdır. Tubulin  $\beta$  II (*TUBB2A/TUBB2B*) anlatımının meme kanserinde arttığı (85) ve baş ve boyun skuamöz karsinomada da arttığı ve kemoterapiye yanıtla ters korelasyon gösterdiği bilinmektedir (86). Bir başka çalışmada ise yüksek *TUBB2A* anlatımı gözlenen solid tümörlü hastalarda kemoterapi ajanı olarak kullanılan paclitaxelin yan etkisi olarak gelişebilen periferik nöropati riskiyle ters ilişkili olduğu ve hücre kültüründe de apoptoz direncine neden olduğu bildirilmiştir (87).

Mikrotübülün yapısına katılan  $\alpha$  ve  $\beta$  tubulinlerinin heterodimer halinde polimerizasyonundan oluşmaktadır ve bu yapıya katılan farklı  $\alpha$  ve  $\beta$  izotiplerinin görece oranlarına göre mikrotübülün dinamik yapısının etkilendiği bilinmektedir (90). Dolayısıyla hücre, gelişimi ve farklılaşmasına bağlı olarak sentezlenmekte olan tubulinlerin izotip oranlarında değişim göstermesi hücre yapı ve fonksiyonu için önemlidir (40). Bizim çalışmamızda, *TUBB2A* geninin anlatım seviyeleri, sağlıklı timosit alt tiplerinde – DN'den DP'ye ve olgun SP4 ve SP8 T hücrelerine farklılaşırken – gelişme evresi ilerledikçe, *TUBB2A* anlatımında bir artışın görülmüştür. En yüksek anlatımlar SP4, SP8'de ve periferik kandan elde edilen CD3+ T hücrelerinde

görülmüştür. Bu bulgular bilgimiz dahilinde, sağlıklı T hücre alt gruplarından elde edilmiş ilk bulgulardır.

Çalışmamızın *TUBB2A* verileri incelendiğinde mikroarray analizlerinden elde ettiğimiz veriler ile uyumlu olarak T-ALL hastalarında kontrol timositlere göre artmış *TUBB2A* anlatımı gözledik. Habis ve selim prostat kanseri tümörleri ile gerçekleştirilen bir mikroarray çalışmasında da *TUBB2A* geni anlatımı, habis tümörlerde artmış olarak belirlenmiş ve kantitatif PZR ile bu artış doğrulanmıştır (99). Daha önce yapılan bir başka çalışmada ise *TUBB2A* anlatımının sağlıklı timusta yok denecek kadar az düzeyde olduğu bildirilmiştir (34). Biz de çalışmamızda sağlıklı timosit alt guruplarını incelediğimizde erken timositlerde son derece düşük miktarda *TUBB2A* olduğunu ve olgunlaşma ilerledikçe yükseldiğini belirledik. Bununla beraber hastalarda gözlediğimiz yüksek anlatım düzeyi, *TUBB2A*'nın T-ALL patogenezinde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde T-ALL hastalarında *TUBB2A* anlatımı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda beyaz kan hücre sayıları 50binin üzerinde olan hastalarda *TUBB2A* anlatımının daha yüksek olduğunu ve daha kısa genel sağkalım gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, bulgularımız yüksek *TUBB2A* anlatımının 33. gün tedavi yanıtızlığına neden olabileceğini işaret etmektedir. *TUBB2A* anlatımının diğer kanser türlerindeki sağ kalıma etkisini incelemek amacıyla başvurduğumuz PRECOG (100) veritabanı bulgularına göre de yüksek *TUBB2A* anlatımı, mesane kanserinde, astrositomada, gliyomada, kolon kanserinde, metastitik melanoma ve over kanserinde kötü prognozla ilişkili olarak gözlenmiştir. Bu verilerin daha geniş hasta gruplarında ve daha uzun takip süreleri ile değerlendirilmesi *TUBB2A*'nın patogenezdaki rolünün aydınlatılması açısından önemlidir.

Tubulin  $\beta$  isotiplerinin birçok kemoterapi ajanının hedefi olması ve bazı izotiplerin de kansere özgü olarak artması veya azalması, bu genlerin kanser spesifik anlatım bozukluklarının fonksiyonel öneminin araştırılmasını önemli kılmaktadır. Çalışmanın devamında artmış *TUBB2A* anlatımının siRNA kullanılarak T-ALL hücre serilerinde baskılanması ve etkilerinin incelenmesi planlanmaktadır.

Han ve arkadaşları, insan ve fareden elde ettikleri hematopoetik kök hücre ve farklı hücre soylarına farklılaşan hücre popülasyonlarında *mir-29a* anlatımını incelemiştir ve en ilkel kök hücrede en yüksek olduğunu ve hücre farklılaşmaya gittikçe anlatımının azaldığı göstermişlerdir (20). Bizim çalışmamızda ise, sağlıklı timus, CD3+ve CD3-

timositler ve periferik kandan elde edilen CD3+ ve CD3- hücrelerde her üç miR-29 ailesi üyelerinin anlatım seviyeleri belirlendi. Periferik kandaki T hücrelerinin miR-29 ailesinin gen anlatımı, timosit hücreleri ve total timus dokusuna göre yüksek bulunmuştur. microRNA.org veritabanına bakıldığında, T hücre olgunlaşmasıyla paralel mir-29a anlatımı arttığı görülmektedir. Bizim çalışmamızda T-ALL hastalarındaki miR-29 ailesi üyelerinin anlatım düzeyleri immün fenotiplerine göre olgun olmayan, kortikal ve olgun T-ALL olarak ayırarak üç grup halinde incelendiğinde, olgun olmayan grubun diğer gruplara nazaran daha yüksek anlatım gösteriği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da mir-29a'nın bir onkomir gibi hareket ettiği düşünülebilir. Oliveira ve arkadaşları 2015'te yayınladıkları çalışmada erişkin ve pediatrik T-ALL hastalarından oluşan bir hasta grubunda, *miR-29a* anlatımının düşük olduğunu bildirmişlerdir ancak bu çalışmada da sağlıklı kontrol örneği olarak periferik T hücresi kullanmıştır (91). mir-29 ailesinin daha önce hepatosellüler karsinoma (32), akciğer kanserinde (92) ve kronik lenfoblastik lösemide (CLL) (28) tümör süpresör olarak davrandığı bildirilmiştir. Han ve arkadaşları (18), miR-29a'nın yüksek anlatımı myeloid progenitörlerin çoğalma kapasitelerinin artışına ve AML gelişimine sebep olabileceğini göstermiştir. Bir başka çalışmada ise miR-29'un düşük anlatımının AML gelişimiyle ilgili olduğu (93-95), *NPM1* mutasyonu taşıyan AML hastalarında miR-29a anlatımının yüksek olduğu gösterilmiştir (96). Bunlar dışında invaziv meme kanserlerinde (97), Diffüz Büyük B-Hücreli Lenfoma (DLBCL) hastalarında (33), hepatosellüler karsinomada (98) yüksek *miR-29* anlatımları gösterilmiştir. *miR-29* ailesi üyeleri, kanser tipine göre hem tümör baskılayıcı hem onkogen gibi davranabilmektedir.

Çalışmamızda mir-29 ailesi üyelerinin anlatımı ile herhangi bir klinik bulgu arasında istatistiksel bir anlamlılık tespit edilememiştir. Bunun nedeni miRNA çalışmasına katılabilen hasta sayısının sınırlı olması ve gruplara ayrıldığında karşılaştırılabilir sonuçlar verememesidir. Her ne kadar Olivera ve arkadaşları kontrol olarak periferik kan kullansalar da çalışmalarında yüksek mir-29a anlatımı gösteren hastalarda genel sağ kalım oranlarını azalmış olarak bildirilmiştir (91). Bizim hasta grubumuzda, yüksek risk grubu (HRG) olarak sınıflandırılan hastalar, özellikle *mir-29b* ve *mir-29c* anlatımının standart (SRG) ve orta (MRG) risk grubu hastalarına göre daha yüksek olması da dikkate alınırsa, mir-29 ailesinin T-ALL'de anlatımının arttığını ve kötü prognostik bir belirteç olabileceği görülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile;

- mRNA mikroarray ve miRNA mikroarray verileri birarada değerlendirilmiştir
- Doğru kontrol grubu kullanımının önemi ortaya konmuştur
- İlk kez T-ALL'de *mir-29a* ve *TUBB2A* yüksek anlatımları tanımlanmıştır
- *TUBB2A* anlatımının T-ALL hastalarındaki sağ kalıma olan etkileri belirlenmiştir
- Veri tabanlarının aksine T-ALL'de *mir-29a* ve *TUBB2A* genlerinin aynı yönde anlatımı olduğu ve etkileşimde olmadıkları belirlenmiştir.



## KAYNAKLAR

1. Schoof CR, Botelho EL, Izzotti A, Vasques Ldos R. MicroRNAs in cancer treatment and prognosis. *Am J Cancer Res* 2012; **2**(4): 414-433.
2. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 2012; **10**(2): 120-136.
3. Weerkamp F. *Molecular Regulation of Early T-cell Development in the Thymus*. The Author; 2005.
4. Koch U, Radtke F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. *Trends Immunol* 2011; **32**(9): 434-442.
5. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012; **122**(10): 3398-3406.
6. Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Van der Meulen J, Boice M, Wolfe AL, Carty M, ve ark. Characterization of a set of tumor suppressor microRNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Signal* 2014; **7**(352): ra111.
7. Heyns M, Kovalchuk O. Non-coding RNAs including miRNAs, piRNAs, and tRNAs in human cancer. *Oncotarget* 2015; **6**(27): 23055-23057.
8. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011; **51**: 25-43.
9. Turchinovich A, Burwinkel B. Distinct AGO1 and AGO2 associated miRNA profiles in human cells and blood plasma. *RNA Biol* 2012; **9**(8): 1066-1075.
10. Mallory AC, Elmayan T, Vaucheret H. MicroRNA maturation and action--the expanding roles of ARGONAUTES. *Curr Opin Plant Biol* 2008; **11**(5): 560-566.
11. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 2007; **28**(2): 328-336.
12. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; **115**(2): 199-208.
13. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; **115**(2): 209-216.
14. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, ve ark. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; **9**(3): 277-279.
15. Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**(2): 141-148.
16. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, ve ark. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003; **35**(3): 215-217.
17. Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, ve ark. MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(32): 14229-14234.
18. Petriv OI, Kuchenbauer F, Delaney AD, Lecault V, White A, Kent D, ve ark. Comprehensive microRNA expression profiling of the hematopoietic hierarchy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(35): 15443-15448.
19. Bissels U, Wild S, Tomiuk S, Hafner M, Scheel H, Mihailovic A, ve ark. Combined characterization of microRNA and mRNA profiles delineates early differentiation pathways of CD133+ and CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2011; **29**(5): 847-857.
20. Han YC, Park CY, Bhagat G, Zhang J, Wang Y, Fan JB, ve ark. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 2010; **207**(3): 475-489.



21. Saki N, Abroun S, Soleimani M, Hajizamani S, Shahjahani M, Kast RE, ve ark. Involvement of MicroRNA in T-Cell Differentiation and Malignancy. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2015; **9**(1): 33-49.
22. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, ve ark. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 2008; **132**(5): 875-886.
23. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Patterson HC, Zhang B, Wang J, ve ark. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008; **9**(4): 405-414.
24. Rossi RL, Rossetti G, Wenandy L, Curti S, Ripamonti A, Bonnal RJ, ve ark. Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4+ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol* 2011; **12**(8): 796-803.
25. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, ve ark. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell* 2007; **129**(1): 147-161.
26. Lu LF, Thai TH, Calado DP, Chaudhry A, Kubo M, Tanaka K, ve ark. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 2009; **30**(1): 80-91.
27. Stittrich AB, Haftmann C, Sgouroudis E, Kuhl AA, Hegazy AN, Panse I, ve ark. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat Immunol* 2010; **11**(11): 1057-1062.
28. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, ve ark. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; **353**(17): 1793-1801.
29. Wang Y, Zhang X, Li H, Yu J, Ren X. The role of miRNA-29 family in cancer. *Eur J Cell Biol* 2013; **92**(3): 123-128.
30. Wang HY, Yan LX, Shao Q, Fu S, Zhang ZC, Ye W, ve ark. Profiling plasma microRNA in nasopharyngeal carcinoma with deep sequencing. *Clin Chem* 2014; **60**(5): 773-782.
31. Wu DW, Hsu NY, Wang YC, Lee MC, Cheng YW, Chen CY, ve ark. c-Myc suppresses microRNA-29b to promote tumor aggressiveness and poor outcomes in non-small cell lung cancer by targeting FHIT. *Oncogene* 2015; **34**(16): 2072-2082.
32. Xiong Y, Fang JH, Yun JP, Yang J, Zhang Y, Jia WH, ve ark. Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; **51**(3): 836-845.
33. Fang C, Zhu DX, Dong HJ, Zhou ZJ, Wang YH, Liu L, ve ark. Serum microRNAs are promising novel biomarkers for diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol* 2012; **91**(4): 553-559.
34. Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clin Chim Acta* 2012; **413**(13-14): 1058-1065.
35. Nguyen T, Kuo C, Nicholl MB, Sim MS, Turner RR, Morton DL, ve ark. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics* 2011; **6**(3): 388-394.
36. Qi Y, Huang Y, Pang L, Gu W, Wang N, Hu J, ve ark. Prognostic value of the MicroRNA-29 family in multiple human cancers: A meta-analysis and systematic review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017; **44**(4): 441-454.

37. Kollinerova S, Vassanelli S, Modriansky M. The role of miR-29 family members in malignant hematopoiesis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2014; **158**(4): 489-501.
38. Yan B, Guo Q, Fu FJ, Wang Z, Yin Z, Wei YB, ve ark. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *Oncotargets Ther* 2015; **8**: 539-548.
39. Sirajuddin M, Rice LM, Vale RD. Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat Cell Biol* 2014; **16**(4): 335-344.
40. Leandro-Garcia LJ, Leskela S, Landa I, Montero-Conde C, Lopez-Jimenez E, Leton R, ve ark. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; **67**(4): 214-223.
41. Arai K, Shibutani M, Matsuda H. Distribution of the class II beta-tubulin in developmental and adult rat tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 2002; **52**(3): 174-182.
42. Fojo AT. *The Role of Microtubules in Cell Biology, Neurobiology, and Oncology*. Humana Press; 2009.
43. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 2010; **10**(3): 194-204.
44. Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, ve ark. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 2004; **429**(6991): 566-571.
45. Tsukumo S, Unno M, Muto A, Takeuchi A, Kometani K, Kurosaki T, ve ark. Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**(26): 10735-10740.
46. Hu G, Chen J. A genome-wide regulatory network identifies key transcription factors for memory CD8(+) T-cell development. *Nat Commun* 2013; **4**: 2830.
47. Schneider C, Setty M, Holmes AB, Maute RL, Leslie CS, Mussolin L, ve ark. MicroRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(22): 8185-8190.
48. Liu SG, Qin XG, Zhao BS, Qi B, Yao WJ, Wang TY, ve ark. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. *Oncol Lett* 2013; **5**(5): 1639-1642.
49. Wilting SM, Snijders PJ, Verlaat W, Jaspers A, van de Wiel MA, van Wieringen WN, ve ark. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene* 2013; **32**(1): 106-116.
50. Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M, Fendler A, Wagner I, Stephan C, ve ark. Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal Biochem* 2011; **417**(2): 233-241.
51. Riffo-Campos AL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int J Mol Sci* 2016; **17**(12).
52. Schnall-Levin M, Rissland OS, Johnston WK, Perrimon N, Bartel DP, Berger B. Unusually effective microRNA targeting within repeat-rich coding regions of mammalian mRNAs. *Genome Res* 2011; **21**(9): 1395-1403.
53. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; **136**(2): 215-233.
54. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; **115**(7): 787-798.
55. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999; **288**(5): 911-940.

56. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 2007; **39**(10): 1278-1284.
57. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; **3**(3): e85.
58. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007; **27**(1): 91-105.
59. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 2010; **11**(8): R90.
60. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; **19**(1): 92-105.
61. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012; **28**(6): 771-776.
62. Zhang Y. miRU: an automated plant miRNA target prediction server. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**(Web Server issue): W701-704.
63. Guo ZW, Xie C, Yang JR, Li JH, Yang JH, Zheng L. MtiBase: a database for decoding microRNA target sites located within CDS and 5'UTR regions from CLIP-Seq and expression profile datasets. *Database (Oxford)* 2015; **2015**.
64. Mandke P, Wyatt N, Fraser J, Bates B, Berberich SJ, Markey MP. MicroRNA-34a modulates MDM4 expression via a target site in the open reading frame. *PLoS One* 2012; **7**(8): e42034.
65. Zhang D, Xiao YF, Zhang JW, Xie R, Hu CJ, Tang B, et al. miR-1182 attenuates gastric cancer proliferation and metastasis by targeting the open reading frame of hTERT. *Cancer Lett* 2015; **360**(2): 151-159.
66. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; **126**(6): 1203-1217.
67. Hsu JB, Chiu CM, Hsu SD, Huang WY, Chien CH, Lee TY, et al. miRTar: an integrated system for identifying miRNA-target interactions in human. *BMC Bioinformatics* 2011; **12**: 300.
68. Xu W, San Lucas A, Wang Z, Liu Y. Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics* 2014; **15 Suppl 7**: S4.
69. Fulci V, Colombo T, Chiaretti S, Messina M, Citarella F, Tavolaro S, et al. Characterization of B- and T-lineage acute lymphoblastic leukemia by integrated analysis of MicroRNA and mRNA expression profiles. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; **48**(12): 1069-1082.
70. Ng OH, Erbilgin Y, Firtina S, Celkan T, Karakas Z, Aydogan G, et al. Deregulated WNT signaling in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer J* 2014; **4**: e192.
71. Tan YS, Kim M, Kingsbury TJ, Civin CI, Cheng WC. Regulation of RAB5C is important for the growth inhibitory effects of MiR-509 in human precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One* 2014; **9**(11): e111777.
72. Eijssen LM, Jaillard M, Adriaens ME, Gaj S, de Groot PJ, Muller M, et al. User-friendly solutions for microarray quality control and pre-processing on ArrayAnalysis.org. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**(Web Server issue): W71-76.
73. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* 2015; **12**(2): 115-121.

74. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004; **20**(3): 307-315.
75. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; **4**(2): 249-264.
76. Bolstad BM, Collin F, Simpson KM, Irizarry RA, Speed TP. Experimental design and low-level analysis of microarray data. *Int Rev Neurobiol* 2004; **60**: 25-58.
77. Heber S, Sick B. Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. *OMICS* 2006; **10**(3): 358-368.
78. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**(7): e47.
79. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2011; **117**(19): 5019-5032.
80. Karrman K, Johansson B. Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2017; **56**(2): 89-116.
81. Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nat Commun* 2014; **5**: 3630.
82. Mets E, Van der Meulen J, Van Peer G, Boice M, Mestdagh P, Van de Walle I, et al. MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015; **29**(4): 798-806.
83. Mets E, Van Peer G, Van der Meulen J, Boice M, Taghon T, Goossens S, et al. MicroRNA-128-3p is a novel oncomiR targeting PHF6 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2014; **99**(8): 1326-1333.
84. Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, Liu X, Mets E, Taghon T, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat Genet* 2011; **43**(7): 673-678.
85. Dozier JH, Hiser L, Davis JA, Thomas NS, Tucci MA, Benghuzzi HA, et al. Beta class II tubulin predominates in normal and tumor breast tissues. *Breast Cancer Res* 2003; **5**(5): R157-169.
86. Cullen KJ, Schumaker L, Nikitakis N, Goloubeva O, Tan M, Sarlis NJ, et al. beta-Tubulin-II expression strongly predicts outcome in patients receiving induction chemotherapy for locally advanced squamous carcinoma of the head and neck: a companion analysis of the TAX 324 trial. *J Clin Oncol* 2009; **27**(36): 6222-6228.
87. Leandro-Garcia LJ, Leskela S, Jara C, Green H, Avall-Lundqvist E, Wheeler HE, et al. Regulatory polymorphisms in beta-tubulin IIa are associated with paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Clin Cancer Res* 2012; **18**(16): 4441-4448.
88. Lu S, Mukkada VA, Mangray S, Cleveland K, Shillingford N, Schorl C, et al. MicroRNA profiling in mucosal biopsies of eosinophilic esophagitis patients pre and post treatment with steroids and relationship with mRNA targets. *PLoS One* 2012; **7**(7): e40676.
89. Gerson KD, Shearstone JR, Maddula VS, Seligmann BE, Mercurio AM. Integrin beta4 regulates SPARC protein to promote invasion. *J Biol Chem* 2012; **287**(13): 9835-9844.

90. Panda D, Miller HP, Banerjee A, Luduena RF, Wilson L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(24): 11358-11362.
91. Oliveira LH, Schiavinato JL, Fraguas MS, Lucena-Araujo AR, Haddad R, Araujo AG, ve ark. Potential roles of microRNA-29a in the molecular pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci* 2015; **106**(10): 1264-1277.
92. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanasi N, Callegari E, ve ark. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**(40): 15805-15810.
93. Zhu C, Wang Y, Kuai W, Sun X, Chen H, Hong Z. Prognostic value of miR-29a expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Biochem* 2013; **46**(1-2): 49-53.
94. Wang XS, Gong JN, Yu J, Wang F, Zhang XH, Yin XL, ve ark. MicroRNA-29a and microRNA-142-3p are regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; **119**(21): 4992-5004.
95. Garzon R, Heaphy CE, Havelange V, Fabbri M, Volinia S, Tsao T, ve ark. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 2009; **114**(26): 5331-5341.
96. Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, ve ark. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**(10): 3945-3950.
97. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep* 2009; **10**(4): 400-405.
98. Kong G, Zhang J, Zhang S, Shan C, Ye L, Zhang X. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PLoS One* 2011; **6**(5): e19518.
99. Haram KM, Peltier HJ, Lu B, Bhasin M, Otu HH, Choy B, ve ark. Gene expression profile of mouse prostate tumors reveals dysregulations in major biological processes and identifies potential murine targets for preclinical development of human prostate cancer therapy. *Prostate* 2008; **68**(14): 1517-1530.
100. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, ve ark. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* 2015; **21**(8): 938-945.

## HAM VERİLER

**Tablo 10: Ek tablo. DAVID zenginleştirme analizi.**

Term	RT	Count	P-Value
UP_KEYWORDS	Immunity	61	1,1E-19
UP_KEYWORDS	Innate immunity	32	1,4E-10
GOTERM_BP_DIRECT	innate immune response	44	3,8E-10
UP_KEYWORDS	Adaptive immunity	24	4,3E-9
GOTERM_BP_DIRECT	inflammatory response	37	4,0E-8
GOTERM_BP_DIRECT	immune response	39	6,5E-8
UP_KEYWORDS	Phosphoprotein	320	7,3E-8
GOTERM_BP_DIRECT	adaptive immune response	21	1,8E-7
UP_KEYWORDS	Chemotaxis	16	2,7E-7
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular space	80	5,1E-7
UP_KEYWORDS	Membrane	291	6,2E-7
GOTERM_CC_DIRECT	cell surface	40	5,5E-6
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of apoptotic process	35	2,1E-5
GOTERM_MF_DIRECT	signal transducer activity	20	6,6E-5
GOTERM_CC_DIRECT	plasma membrane	178	7,5E-5
GOTERM_BP_DIRECT	leukocyte migration	15	8,0E-5
GOTERM_BP_DIRECT	chemotaxis	15	8,0E-5
KEGG_PATHWAY	Transcriptional misregulation in cancer	19	1,2E-4
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of protein phosphorylation	8	1,3E-4
UP_KEYWORDS	Immunoglobulin domain	34	1,9E-4
UP_KEYWORDS	Inflammatory response	15	2,6E-4
UP_KEYWORDS	Apoptosis	33	3,0E-4
GOTERM_MF_DIRECT	IgG binding	5	3,5E-4
GOTERM_MF_DIRECT	phospholipase inhibitor activity	5	3,5E-4
GOTERM_CC_DIRECT	hemoglobin complex	5	4,8E-4
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of angiogenesis	13	6,1E-4
GOTERM_BP_DIRECT	apoptotic process	36	6,5E-4
UP_KEYWORDS	Alternative splicing	367	7,3E-4
UP_KEYWORDS	Proto-oncogene	18	1,1E-3
KEGG_PATHWAY	Chemokine signaling pathway	18	1,2E-3
GOTERM_BP_DIRECT	T cell costimulation	10	1,4E-3
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular region	76	1,7E-3
GOTERM_BP_DIRECT	blood vessel development	7	1,8E-3
KEGG_PATHWAY	Cytokine-cytokine receptor interaction	20	2,0E-3
GOTERM_BP_DIRECT	movement of cell or subcellular component	10	2,8E-3
GOTERM_BP_DIRECT	chronic inflammatory response	4	2,9E-3
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of cell proliferation	29	3,2E-3
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of cell adhesion	7	3,4E-3
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cytoskeleton organization	5	3,6E-3
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cell size	5	4,4E-3

GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to starvation	7	5,3E-3
GOTERM_BP_DIRECT	leukocyte migration involved in inflammatory response	4	5,5E-3
UP_KEYWORDS	Receptor	70	5,6E-3
INTERPRO	Src homology-3 domain	16	5,6E-3
UP_KEYWORDS	Transmembrane	204	5,7E-3
GOTERM_MF_DIRECT	protein homodimerization activity	39	5,8E-3
KEGG_PATHWAY	NOD-like receptor signaling pathway	8	5,9E-3
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	12	6,3E-3
UP_KEYWORDS	Alternative promoter usage	9	6,6E-3
UP_KEYWORDS	Cell membrane	122	6,8E-3
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of calcineurin-NFAT signaling cascade	3	6,8E-3
INTERPRO	Basic leucine zipper domain, Maf-type	4	7,8E-3
GOTERM_BP_DIRECT	response to cytokine	7	8,7E-3
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	13	1,0E-2
GOTERM_CC_DIRECT	extracellular matrix	19	1,0E-2
GOTERM_BP_DIRECT	angiogenesis	16	1,1E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to mechanical stimulus	8	1,1E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cell proliferation	14	1,2E-2
UP_KEYWORDS	Stress response	9	1,2E-2
GOTERM_CC_DIRECT	cell-cell junction	13	1,3E-2
KEGG_PATHWAY	Pathways in cancer	26	1,4E-2
GOTERM_BP_DIRECT	induction of positive chemotaxis	4	1,4E-2
GOTERM_MF_DIRECT	actin filament binding	11	1,4E-2
GOTERM_BP_DIRECT	signal transduction	55	1,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	receptor internalization	6	1,6E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cell adhesion	26	1,6E-2
GOTERM_MF_DIRECT	transcription factor binding	18	1,7E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	4	1,9E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of histone H3-K4 methylation	4	1,9E-2
KEGG_PATHWAY	Hematopoietic cell lineage	9	2,0E-2
GOTERM_CC_DIRECT	T cell receptor complex	4	2,1E-2
GOTERM_CC_DIRECT	death-inducing signaling complex	3	2,1E-2
GOTERM_BP_DIRECT	integrin-mediated signaling pathway	9	2,1E-2
GOTERM_CC_DIRECT	endosome membrane	13	2,1E-2
GOTERM_MF_DIRECT	histone deacetylase binding	9	2,2E-2
GOTERM_MF_DIRECT	cytoskeletal protein binding	6	2,3E-2
UP_KEYWORDS	Mitochondrion outer membrane	9	2,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	response to vitamin A	4	2,3E-2
UP_KEYWORDS	Actin-binding	16	2,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cell shape	11	2,3E-2
KEGG_PATHWAY	TNF signaling pathway	10	2,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	5	2,6E-2
KEGG_PATHWAY	MAPK signaling pathway	18	2,6E-2

KEGG_PATHWAY	Cell adhesion molecules (CAMs)	12	2,6E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cell surface receptor signaling pathway	17	2,8E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of interleukin-8 biosynthetic process	3	2,9E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of protein phosphorylation	10	3,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis	10	3,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	24	3,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of apoptotic process	14	3,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	response to drug	18	3,4E-2
INTERPRO	Death-like domain	8	3,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of immune response	3	3,6E-2
GOTERM_BP_DIRECT	B cell receptor signaling pathway	6	3,8E-2
UP_KEYWORDS	Protease inhibitor	9	3,8E-2
GOTERM_MF_DIRECT	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate binding	5	3,9E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of protein complex assembly	4	3,9E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	12	4,0E-2
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of tumor necrosis factor production	5	4,1E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cell migration	7	4,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	acute-phase response	5	4,4E-2
KEGG_PATHWAY	Leukocyte transendothelial migration	10	4,6E-2
GOTERM_BP_DIRECT	extracellular matrix disassembly	7	4,7E-2
UP_SEQ_FEATURE	DNA-binding region:ETS	4	5,1E-2
GOTERM_MF_DIRECT	laminin binding	4	5,1E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cellular protein metabolic process	9	5,1E-2
UP_SEQ_FEATURE	zinc finger region:RING-type 2	3	5,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of MAP kinase activity	6	5,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of axon extension	3	5,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	peptidyl-threonine dephosphorylation	3	5,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of cytokine secretion	3	5,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to amino acid starvation	4	5,3E-2
GOTERM_BP_DIRECT	response to tumor necrosis factor	4	5,3E-2
KEGG_PATHWAY	Natural killer cell mediated cytotoxicity	10	5,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	negative regulation of protein kinase activity	8	5,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cell cycle arrest	10	5,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of T cell proliferation	6	5,5E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of apoptotic process	17	5,6E-2
GOTERM_BP_DIRECT	positive regulation of interleukin-8 production	4	5,9E-2
KEGG_PATHWAY	Toll-like receptor signaling pathway	9	6,1E-2
GOTERM_CC_DIRECT	actin cytoskeleton	13	6,1E-2
GOTERM_BP_DIRECT	cellular response to epinephrine stimulus	3	6,2E-2
GOTERM_BP_DIRECT	regulation of necrotic cell death	3	6,2E-2
KEGG_PATHWAY	Jak-STAT signaling pathway	11	6,4E-2



**FORMLAR**

**ETİK KURUL KARARI**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 1821

Tarih : 26.10.2015

Konu : Doç. Dr. Müge SAYITOĞLU

Sayın Doç. Dr. Müge SAYITOĞLU  
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi :Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünün 05/10/2015 gün ve 362 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Khusan Khodzhaev' in yürüteceği 2015/1809 dosya numaralı "Akut lenfoblastik lösemi hastalarına ait tüm genom ekspresyon datasında regülatör miRNA'ların saptanması ve validasyonu" başlıklı çalışma kurulumuzun 23/10/2015 tarih ve 18 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

**PATENT HAKKI İZİNİ**

**TELİF HAKKI İZİNİ**