



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

MİKOZİS FUNGOİDES TANILI HASTALARDA TOLL
BENZERİ RESEPTÖRLER İLE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİM
YOLAĞI VE miRNA'LARIN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN VE T HÜCRE KLONALİTESİNİN
BELİRLENMESİ

Mücahit SEÇME

Aralık 2019
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MİKOZİS FUNGOİDES TANILI HASTALARDA TOLL BENZERİ
RESEPTÖRLER İLE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİM YOLAĞI VE
miRNA'LARIN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN VE T HÜCRE
KLONALİTESİNİN BELİRLENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Mücahit SEÇME

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Denizli, 2019

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar" gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Metinleri ekte sunulmuştur):

EK-1. Kilic ID, Dodurga Y, Uludag B, Alihanoglu YI, Yildiz BS, Enli Y, **Secme M**, Bostancı HE. MicroRNA -143 and -223 in obesity. **Gene**. 2015;15;560(2):140-2. doi: 10.1016/j.gene.2015.01.048.

EK-2. Eroğlu C, **Seçme M**, Bağcı G, Dodurga Y. Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. **Tumour Biol**. 2015;36(12):9437-46. doi: 10.1007/s13277-015-3689-3.

EK-3. Dodurga Y, **Seçme M**, Eroğlu C, Gündoğdu G, Avcı ÇB, Bağcı G, Küçükataş V, Lale Şatıroğlu-Tufan N. Investigation of the effects of a sulfite molecule on human neuroblastoma cells via a novel oncogene URG4/URGCP. **Life Sci**. 2015: 15;143:27-34. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.005.

EK-4. Fahrioğlu U, Dodurga Y, Elmas L, **Seçme M**. Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells in vitro. **Gene**. 2016 :15;576:476-82. doi: 10.1016/j.gene.2015.10.061.

EK-5. **Seçme M**, Eroğlu C, Dodurga Y, Bağcı G. Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Gene**. 2016;1;585(1):93-99. doi: 10.1016/j.gene.2016.03.038.

EK-6. Topak OZ, Ozdel O, Dodurga Y, **Secme M**. An evaluation of the differences in DNA damage in lymphocytes and repair efficiencies in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder. **Schizophr Res**. 2018;202:99-105. doi: 10.1016/j.schres.2018.06.052.

EK-7. Gundogdu G, Dodurga Y, Cetin M, **Secme M**, Cicek B. The cytotoxic and genotoxic effects of daidzein on MIA PaCa-2 human pancreatic carcinoma cells and HT-29 human colon cancer cells. **Drug Chem Toxicol**. 2018;5:1-7. doi: 10.1080/01480545.2018.1527849.

EK-8. Elmas L, **Secme M**, Mammadov R, Fahrioglu U, Dodurga Y. The determination of the potential anticancer effects of Coriandrum sativum in PC-3 and LNCaP prostate cancer cell lines. **J Cell Biochem**. 2019;120(3):3506-3513. doi: 10.1002/jcb.27625.

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Mücahit SEÇME tarafından Prof.Dr. İbrahim AÇIKBAŞ yönetiminde hazırlanan "Mikozis Fungoides Tanılı Hastalarda Toll Benzeri Reseptörler ile İlişkili Sinyal İletim Yolağı ve miRNA'ların Ekspresyon Profillerinin ve T Hücre Klonalitesinin Belirlenmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:
(Danışman)

Prof.Dr. İbrahim AÇIKBAŞ
Pamukkale Üniversitesi



Üye:

Prof.Dr. Nida KAÇAR
Pamukkale Üniversitesi



Üye:

Doç.Dr. Selda ŞİMŞEK
Pamukkale Üniversitesi



Üye:

Doç.Dr. Çiğir BİRAY AVCI
Ege Üniversitesi



Üye:

Doç.Dr. Tuba EDGÜNLÜ
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.01.2020 tarih ve ...03-3... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

YAYIN BEYAN SAYFASI

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı: Mücahit SEÇME

İmza:



ÖZET

MİKOZİS FUNGOİDES TANILI HASTALARDA TOLL BENZERİ RESEPTÖRLER İLE İLİŞKİLİ SİNYAL İLETİM YOLAĞI VE miRNA'LARIN EKSPRESYON PROFİLLERİNİN VE T HÜCRE KLONALİTESİNİN BELİRLENMESİ

Mücahit SEÇME

Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji AD.

Tez Yöneticisi: Prof.Dr. İbrahim AÇIKBAŞ

Aralık 2019, 115 Sayfa

Kutanöz T hücreli lenfomalar (KTHL) deride bulunan malign klonal CD4⁺ T lenfositlerle karakterize bir hastalık grubudur. Mikozis fungoides (MF) KTHL'lerin en sık görülen tipi olup, kutanöz T hücreli lenfomaların %60'ını, tüm primer kutanöz lenfomalarında %50'sini kapsamaktadır. MF'nin patogenezi henüz tam anlamıyla tespit edilememiştir. Toll-benzeri reseptörler (TLR)'ler spesifik olarak ilgili ekzojen ve endojen ligandlarını tanımakta ve böylece hücredeki çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerini uyarmakta ve bunun sonucunda da doğal immunitenin aktive olmasını sağlamaktadır. miRNA'lar, TLR'ler de dahil olmak üzere inflamasyon ilişkili genleri hedefleyerek immun hücre fonksiyonlarının çeşitli yönleriyle düzenlenmesinde rol alırlar. Çalışmamızda, tüm TLR'lerin ve bu sinyal iletiminde rol alan genlerin ve miRNA'lar ile downstreamindeki hedef genlerin ekspresyon profillerinin değişimini belirleyerek hastalığın mekanizmasındaki olası rollerini hem hasta dokuları hem de hücre kültürü üzerinden anlamaya çalışmaktayız. Ayrıca T hücre klonalite çalışması ile olgulardaki klonal durumun tespiti ve klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda 52 MF ve 50 kontrol parafin blok materyalinde ve MF hücre hattı olan MJ'de Real-time PCR ile *TLR 1-10, MyD88, TIRAP, IRAK4, TRAF6, IRF7, TRAF3, TRIF(TICAM-1), MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 (p38), Elk1, NFkB (REL-A), IRAK1 ve TAB2* ile *hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-424-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-210-3p ve hsa-miR-204-5p*'nin ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. KEGG veri tabanı kullanılarak yolak analizi ve çalışılan miRNA'ların görev aldığı veya ilişkili olduğu sinyal iletim yolları belirlendi ve String analizi yapılarak protein-protein ilişkisi ve etkileşimi teyit edildi. T hücre reseptörü (THR) gama klonalite değişimi İnvivoscribe IdentiClone™ T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 ile multipleks PCR kullanılarak gerçekleştirildi. Yalancı pozitifliği önlemek için heterodupleks analizi yapıldı ve dikey jel elektroforezi ile görüntüleme işlemleri gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda hem hasta grubu hem de hücre hattı değerlendirildiğinde *TLR -1,-4,-8, IRF7, TRAF3, MEK1, MEK2, Elk1 ve NFkB* mRNA ekspresyonlarında ve *hsa-miR-21-5p, hsa-miR-155-5p* miRNA ekspresyonlarındaki artışlar ve *hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-210-3p ve hsa-let-7e-5p* ekspresyonlarında anlamlı azalma tespit edildi. THR gama klonalite değişim sonuçlarına göre, olgularımıza ait çalışılan DNA'ların %55,5 monoklonal ve biallelik olduğu ve %45,5 oranında poliklonalite özellik gösterdiği saptandı. Tüm bu sonuçlar, TLR sinyal yolağının MF patogeneziindeki olası rolü ve tedavi açısından potansiyelini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mikozis fungoides, Toll benzeri reseptörler, miRNA'lar, Klonalite

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018SABE004).

ABSTRACT
DETERMINATION OF T-CELL CLONALITY AND EXPRESSION PROFILES OF TOLL-LIKE RECEPTORS RELATED SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY AND miRNAs IN PATIENTS WITH MYCOSIS FUNGOIDES

Mücahit SEÇME

PhD Thesis in Medical Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ (PhD)

December 2019, 115 Pages

Cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) are a group of diseases characterized by malignant clonal CD4 + T lymphocytes in the skin. Mycosis fungoides (MF) is the most common type of CTCL and includes 60% of cutaneous T cell lymphomas and 50% of all primary cutaneous lymphomas. The pathogenesis of MF has not yet been fully determined. Toll-like receptors (TLRs) specifically recognize their respective exogenous and endogenous ligands, thereby stimulating the expression levels of various genes and activates the natural immunity in the cell. miRNAs play role in the regulation of various aspects of immune cell function by targeting inflammation-related genes, including TLRs. In our study, we aimed to understand the possible roles of all Toll-like receptors and the genes involved in this signal transduction and the expression profiles of miRNAs and downstream target genes in the mechanism of the disease through both patient tissues and cell culture. In addition, clonal status and compare it with the clinicopathological data were determined by T cell clonality assay. In this context, expression status of *TLR 1-10, MyD88, TIRAP, IRAK4, TRAF6, IRF7, TRAF3, TRIF(TICAM-1), MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 (p38), Elk1, NFkB (REL-A), IRAK1 ve TAB2, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR—224-5p, hsa-miR-155-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-424-5p, hsa-let-7e-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR- 210-3p* and *hsa-miR—204-5p* were determined by RT-PCR in 52 MF and 50 control paraffin block material and MF cell line MJ. Pathway analysis and signal transduction pathways involved or associated with miRNAs were investigated via KEGG database and the protein-protein relationship and interaction was confirmed by string analysis. The T cell receptor (TCR) gamma clonality change was performed using multiplex PCR with Invivoscribe IdentiCon™ T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0. Heteroduplex analysis was performed to avoid false positivity, and imaging was performed with the PAGE system. According to the result of the study, when both the patient group and cell line were evaluated, increased expressions in *TLR -1, -4, -8, IRF7, TRAF3, MEK1, MEK2, Elk1, NFkB* hsa-miR-21-5p, hsa-miR-155-5p and decreased expressions in *hsa-miR-130a-3p, hsa-miR- 210-3p ve hsa-let-7e-5p* were determined. According to the results of TCR gamma clonal change, the DNAs studied in our cases exhibited 55.5% monoclonal and biallicity and 45.5% polyclonality was determined. All these results show the potential role and treatment potential of Toll-like receptor signaling pathway in MF pathogenesis.

Key Words: Mycosis fungoides, Toll-like receptors, miRNAs, clonality

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project numbers: 2018SABE004).

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana her türlü desteği veren, tezimin yürütülmesinde her türlü bilimsel desteği sağlayan ve akademik eğitimime katkı sunan Tıbbi Biyoloji AD. Başkanı ve çok değerli danışman hocam Prof. Dr. İbrahim Açıkbaz'a

Akademik hayatıma adım attığım günden bu yana bana her türlü bilimsel desteği veren, değerli bilgilerini benden esirgemeyen, kılavuzluk yapan, tez çalışmamın şekillenmesinde ve yürütülmesinde katkı sunan çok değerli hocam Doç.Dr. Yavuz Dodurga'ya,

Tez çalışmamda projenin şekillenmesinde, örneklerin temininde katkılarını esirgemeyen ve değerleri zamanlarını ayırarak bilimsel desteklerini sunan değerli hocalarım Prof.Dr. Nida Kaçar ve Prof.Dr. Neşe Demirkan'a,

Klonalite deneyleri için bana laboratuvarlarını açan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji AD. Öğretim üyesi Doç.Dr. Nur Selvi Günel'e ve yine deney sırasındaki içten yardımları ve arkadaşlıkları için Araş.Gör. Mesude Angın ve Ali Kaygusuz'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli bölüm hocalarım Doç.Dr. Selda Şimşek ve Prof.Dr. A. Gaye Tomatır'a, içten dostlukları ve katkıları için başta Araş.Gör.Dr. Levent Elmas olmak üzere tüm bölüm asistan arkadaşlarıma,

Tez Projemin gerçekleşmesi için gerekli kaynağı sağlayan, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP), PAÜ Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü (ÖYP) ve PAÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne,

Bu süreçte bana her zaman desteğini sunan ve her koşulda yanımda olan sevgili eşime, doğduğu günden bu yana hayatımı aydınlatan en değerli varlığım canım kızıma ve bütün hayatım boyunca maddi manevi desteğini benden esirgemeyen canım ailem, annem, babam ve kardeşime sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Pimer Kutanöz T Hücreli Lenfomalar	3
2.2. Mikozis Fungoides.....	5
2.2.1. Tanım ve Epidemiyoloji	5
2.2.2. Etiyoloji ve Patogenez	5
2.2.3. Klinik.....	9
2.2.4. Prognoz.....	11
2.2.5. Tanı.....	11
2.2.6. Evreleme.....	13
2.2.7. Tedavi.....	15
2.3. T Hücre Reseptörü (THR) ve Klonalite	17
2.3.1. T Hücre Reseptörü: Yapı ve Fonksiyonları	17
2.3.2. T Hücre Reseptör Gen Rearranjmanı (Yeniden Düzenlenmesi)	18
2.3.3. T Hücre Klonalitesi	20
2.3.4. Mikozis Fungoides ve T Hücre Klonalitesi.....	21
2.4. Toll-Benzeri Reseptörler (Toll-like Reseptörleri, TLR).....	22
2.4.1. TLR Ailesi, Yapı, Lokalizasyon ve Özellikler	22
2.4.2. TLR'nin Sinyalizasyonu	25
2.4.3. Dermatolojik Hastalıklarda Toll Benzeri Reseptörler	27
2.5. Mikro RNA'lar (miRNA'lar)	27
2.5.1. miRNA Biyogenezi	27
2.5.2. miRNA ve Toll Benzeri Reseptörler İlişkisi.....	29
2.5.3. Kutanöz T Hücreli Lenfomada miRNA'ların Rolü	29
2.6. Hipotez	30
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31

3.1. Çalışma Materyalinin Seçimi, Toplanması ve Mikrotom ile Kesit Alma	31
3.2. Hücre Kültürü	31
3.3. RNA İzolasyonu	33
3.3.1. Parafine Gömülü Dokudan Kit ile RNA İzolasyonu.....	33
3.3.2. Trizol ile Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu	35
3.4. cDNA (Komplementer DNA) sentezi.....	36
3.4.1. mRNA Ekspresyon Değişimi İçin cDNA Sentezi	36
3.4.2. Mikro RNA Ekspresyon Değişimi İçin miRNA cDNA Sentezi.....	37
3.5. Real- Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	38
3.5.1. Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyon Analizi.....	38
3.5.2. Real-Time PCR ile Mikro RNA (miRNA) Ekspresyon Analizi.....	40
3.6. Web Tabanlı Programlar Yardımıyla miRNA Hedef Tayini ve Etkileşim Analizleri 42	
3.7. DNA İzolasyonu	43
3.8. T Hücre Reseptörü Gama Klonalite Testleri	45
3.8.1. Klonalite Testine Uygun DNA Seçimi.....	45
3.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi	46
3.8.3. Multipleks PCR Reaksiyonları	46
3.8.4. Heterodupleks Analizi.....	47
3.8.5. Dikey Jel Elektroforezi (PAGE) ve Görüntü Analizi	47
3.9. İstatistiksel Analiz	48
4. BULGULAR.....	49
4.2. Mikozis Fungoides Hasta Grubu ve Kontrol Grubuna ait Demografik Veriler	49
4.2. Real-Time PCR Sonuçları	51
4.2.1. Mikozis Fungoides Hasta Grubunda mRNA Ekspresyon Değişimleri	51
4.2.2. Mikozis Fungoides Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Değişimleri.....	55
4.2.3. Mikozis Fungoides Hasta Grubunda miRNA Ekspresyon Değişimleri.....	59
4.2.4. Mikozis Fungoides Hücre Hattında miRNA Ekspresyon Değişimleri	61
4.3. miRNA Hedef Tespiti ve Etkileşim Analizi.....	64
4.4. T Hücre Klonalitesi Sonuçları	69
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇLAR.....	91
7. KAYNAKLAR	93
8. ÖZGEÇMİŞ.....	106
9. EKLER.....	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Mikozis Fungoides patogenezinde etkili olan faktörler (Sokolowska-Wojdylo vd 2015' den modifiye edilmiştir).....	6
Şekil 2.2 Kutanöz T Hücreli Lenfoma patogenezinde rol oynayan önemli genler ve etkileşimleri (Dulmage ve Geskin 2013)	8
Şekil 2.3 Erken ve geç evre MF/SS'de sitokin ekspresyonlarının hücrel değişimi (Wong vd 2011' den modifiye edilmiştir).....	9
Şekil 2.4 KTHL evrelere göre primer tedavi haritası (Duvic 2015'den modifiye edilmiştir)	16
Şekil 2.5 Örnek olarak CD4 T hücresi kullanılarak yapılan peptit antijen MHC kompleksi ile TCR ile bağlantı şeması (Web_1).....	18
Şekil 2.6 T hücre reseptörü gen organizasyonu (Hodges vd 2003)	19
Şekil 2.7 a) Toll benzeri reseptörler için tasarlanmış yapısal model (Akira ve Takeda 2004) b) TLR için dimer oluşturduğunda ortaya çıkan şematize kristallografi modeli ve TLR2 ve TLR6 dimer örneği (Botos vd 2001).....	23
Şekil 2.8 TLR Sinyal İletim Yolağı diyagramı	26
Şekil 2.9 miRNA biyogenezi (Winter vd 2009)	28
Şekil 3.1 Çalışmamızda kullanılan hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri (10X büyütme).....	32
Şekil 3.2 Yeniden düzenlenmiş T hücre reseptörü gama geninin basitleştirilmiş diyagramı ve master mix içeriği (Web_11).....	47
Şekil 4.1 Hasta grubu örneklerine ait yaş dağılımı grafiği.....	50
Şekil 4.2 Çalışmadaki hasta grubuna ait örneklerin cinsiyet dağılımını gösteren grafik.....	50
Şekil 4.3 Çalışmamızdaki kontrol grubuna ait örneklerin yaş aralığı dağılımını gösteren grafik.....	51
Şekil 4.4 Çalışmadaki hasta grubuna ait örneklerin cinsiyet dağılımını gösteren grafik.....	51
Şekil 4.5 MF hasta grubunda Toll Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Değişimleri (*:(p<0.05)	54
Şekil 4.6 MF hasta grubunda Toll Benzeri Reseptörlerle İlişkili Ekspresyon Değişimleri (*:(p<0.05)	54
Şekil 4.7 MJ Hücre Hattında Toll Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Değişimleri (*:p<0.05).....	57
Şekil 4.8 MJ Hücre Hattında Toll Benzeri Reseptörlerle İlişkili Genlerin Ekspresyon Değişimleri (*:p<0.05).....	58
Şekil 4.9 Hasta örnekleri ve hücre hattında anlamlı değişim gösteren genlerin karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.10 Mikozis fungoides tanılı hastaların kontrol grubu ile karşılaştırıldığındaki miRNA ekspresyon değişimi.....	61
Şekil 4.11 Mikozis fungoides hücre hattı MJ'deki kontrole kıyasla miRNA ekspresyon değişimleri	63
Şekil 4.12 Hasta örnekleri ve hücre hattında anlamlı değişim gösteren miRNA'ların karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.13 Çalışmada kullanılan miRNA'ların KEGG heatmap analizi sonucu	67
Şekil 4.14 Çalışılan genlerin protein-protein etkileşimini gösteren string analizi sonucu	68
Şekil 4.15 Çalışılan genlerin protein-RNA etkileşimini gösteren string analizi sonucu	69
Şekil 4.16 DNA örneklerinin T hücre reseptörü gama klonalitesi belirlenmesi için agaroz jelde kaliteli DNA'ların tespiti.....	70

Şekil 4.17 Çalışılan olguların TCRA için poliakrilamid jel görüntüleri.....	71
Şekil 4.18 Çalışılan olguların TCRB için poliakrilamid jel görüntüleri.....	72



TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 2018 yılı Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Kanseri Tedavisi Araştırma Organizasyonu kutanöz T hücreli lenfoma sınıflandırması (Willemze vd 2019)	3
Tablo 2.2 Mikoziş fungoidesin TNBM sınıflandırması (Bunn ve Lamberg 1979, Onsun 2007)	13
Tablo 2.3 MF ve SS'de güncel ISCL/EORTC sınıflandırması (Olsen vd 2007).....	14
Tablo 2.4 T hücre reseptörlerini kodlayan genler ve kromozomal organizasyon bilgileri (Hodges vd 2003).....	19
Tablo 2.5 TLR ligandları, adaptör proteinleri ve indüklediği sitokin ve kemokinler (İnci ve Pişkin 2007, Erickson vd 2008, Güven ve Can 2012).....	24
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan hücre hatlarının karakteristik özellikleri (Web_3, Web_4)	32
Tablo 3.2 cDNA sentez kit karışımı (AB)	36
Tablo 3.3 Mikro RNA CDNA Sentez kiti karışımı (abm)	37
Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan genlerin reverse ve forward dizileri	38
Tablo 3.5 Çalışmamızda kullanılan miRNA bilgileri	41
Tablo 4.1 Kontrol ve hasta grubuna ait örneklerin yaş dağılımı tablosu	49
Tablo 4.2 Kontrol ve mikoziş fungoides hasta grubundaki mRNA düzeyindeki gen ekspresyon değişimleri	52
Tablo 4.3 MJ mikoziş fungoides hücre hattının BJ hücre hattı ile karşılaştırıldığında mRNA düzeyindeki gen ekspresyon değişimleri	55
Tablo 4.4 Kontrol ve mikoziş fungoides hasta grubundaki miRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri	60
Tablo 4.5 MJ hücre hattında kontrolle kıyaslandığında miRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri	62
Tablo 4.6 Çalışılan miRNA'ların miRTarbase ve Diana Tools veri tabanlarındaki olası hedef mRNA'ları	65
Tablo 4.7 Çalışmada kullanılan miRNA'ların KEGG yolak analizi	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APS.....	Amonyum persülfat
AP1.....	Aktivatör Protein 1
AR.....	Aktinik retinoid
cDNA.....	komplementer DNA
CREB.....	cAMP yanıt elementine bağlanan pretein
DMSO.....	Dimetilsülfoksit
EBV.....	Eptein-Barr virüs
EORTC.....	Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü
eMF.....	Eritrodermik mikozis fungoides
XPO5.....	Eksportin 5
ERK.....	Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
EtBr.....	Etidyum Bromid
FFPE.....	Formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku
HHV.....	İnsan herpes virüs 1
HLA.....	İnsan lökosit antijeni
HSV.....	Herpes simpleks virus
HTLV-1.....	İnsan T lenfotropik virüs 1
Ig.....	İmmunoglobülin
IL.....	İnterlökin
IRAK.....	IL reseptör ilişkili kinaz
IRF.....	İnterferon regülatör faktör
ISCL.....	Uluslararası Kutanöz Lenfomalar Derneği
JAK.....	Janus kinaz ailesi
JNK.....	Jun terminal kinaz
KBHL.....	Kutanöz B hücreli lenfoma
KEGG.....	Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi
kDa.....	kilodalton
KTHL.....	Kutanöz t hücreli lenfoma
LyP.....	Lenfomatoid papüloz
MAL.....	MyD88 adaptör kinaz
MAPK.....	Mitojenle aktive edilen kinaz

mRNA.....	mesajcı RNA
miRNA.....	mikro RNA
ml.....	Mililitre
MyD88.....	Myeloid farklılaşma faktörü 88
MF.....	Mikozis fungoides
ncRNA.....	Kodlamayan (non-coding) RNA
NFkB.....	Nükleer faktör kappa B
ODN.....	Oligodeoksinükleotit
PBMc.....	Periferel mononükleer hücreler
RISC.....	RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi
RT-PCR.....	Gerçek-zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
STAT.....	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
SS.....	Sezary sendrom
TAK.....	TGF aktive edilen protein kinaz
THR.....	T hücre Reseptörü
TIRAP.....	TIR ilişkili protein
TLR.....	Toll benzeri reseptör
TNF- α	Tümör nekroz faktörü alfa
TNM.....	Tömör nod metastaz
TRAF.....	TNF reseptör ilişkili faktör
UV.....	Ultraviyole
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Deri, gastrointestinal sistemden sonra lenfomada en sık ektranodal tutulumun olduğu bölgedir. Deri lenfomaları T ve B hücrelerinden köken alan ve histopatolojik, immünolojik ve klinik olarak farklı özellikler ile seyreden heterojen bir neoplastik hastalık grubudur. Bu farklılıklar nedeniyle yakın zamanda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü (EORTC) tarafından deri lenfoma sınıflandırma sistemi yayınlanmıştır (Piliotis vd 2007, Willemze vd 2019).

Primer kutanöz lenfomalar, esas olarak deride lenfotik proliferasyon gösteren fakat ileri evrede zamanla lenf nodu, kemik iliği ve iç organlara yayılabilen non-Hodgkin lenfomalardır. Olguların %75'ini kutanöz T hücreli lenfomalar (KTHL) ve %25'ini ise kutanöz B hücreli lenfoma (KBHL) oluşturur (Sokolowska-Wojdyło vd 2015, Willemze vd 2019a). Primer kutanöz T hücreli lenfomalar diğer deri lenfomaları ile karşılaştırıldığında en sık görülen lenfoma tipi olmakla birlikte deride bulunan malign klonal CD4⁺ T lenfositlerle karakterize bir hastalık grubudur (Keehn vd 2007). KTHL'lerin yıllık insidansı ise batı ülkeleri için 1/100000 olarak bildirilmiştir (Willemze vd 2018). KTHL'lerin en sık görülen iki alt tip Mikozis fungoides (MF) ve Sezary Sendromudur (SS). MF, kutanöz T hücreli lenfomaların %60'ını, tüm primer kutanöz lenfomalarında %50'sini kapsamaktadır (Willemze vd 2019). MF'in etyolojisi ve moleküler patogenezi henüz tam anlamıyla tespit edilememiştir. Çeşitli immünolojik, genetik ve çevresel hipotezler üretilmiş olmakla birlikte son yapılan araştırmalar sonucunda kabul edilen hipotez ise T hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ile programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz mekanizmasına karşı geliştirilen direnç ve bunun sonucu olarak da kronik kutanöz inflamasyonun lenfoma gelişimini tetiklediği yönündedir (Lidija Kandolf Sekulović vd 2009).

Erken MF şüphesi bulunan vakaların yavaş bir seyir göstermesi, klinik ve histopatoloji sonuçları arasındaki uyumsuzluklar ve ayrıca klinik ve patolojik olarak benign dermatozlarla karıştırılması durumları ayırıcı tanıda ciddi zorluklara sebep olabilmektedir. Ekzema ve psöriasis gibi grupları da içeren benign inflamatuvar hastalıklar ile erken MF olguları arasındaki klinik benzerlik gözlemciler tarafından göreceleri değerlendirmelere neden olabilmektedir (Nashan vd 2007). MF tanısında en sık kullanılan yöntemler histopatoloji ve immunohistokimyasal yöntemler olmakla birlikte bu durum hastalardan birçok defa biyopsi alınmasına neden olmakta ve hastaların yaşam kalitesi de etkilenebilmektedir. Son yıllarda MF tanısında daha etkili, hızlı sonuç alınabilen, duyarlılığı yüksek ve ayrıca hastalar için invazif olmayan yöntemler de aranmaktadır. T hücre reseptör (THR) gen yeniden düzenlenmesinin dermatoloji

alanında da kullanılmaya başlaması ile lenfoid klonalitenin ve baskın klonun tespit edilebilmesi ve derideki inflamasyonun poliklonal ya da monoklonal olup olmadığının belirlenmesi tanıda yardımcı yöntemler olarak kullanılmaktadır (Kazakov vd 2004).

MF hakkında tüm bilgilerimize rağmen hastalığın etyopatogenezi, epidemiyolojik, klinik ve genetik bilgilerimizdeki kısıtlamalar ve histolojik özelliklerin tanısal değerinin tam yeterli düzeyde olmaması gibi durumlar çok sık karşılaşılmayan MF'in tanı tedavi ve hastalığın hücresel mekanizması ilgili yapılacak olan özellikle detaylı moleküler biyolojik çalışmaların arttırılmasını gerektirmektedir. Hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların tespiti ve hastalığın farklı evrelerinde bu hastalıkla ilişkili hücresel sinyal iletim mekanizmalarındaki genetik değişimlerin tespiti, bu değişimler ile klinikopatolojik verilerin karşılaştırılması hem hastalığın tanı ve teşhisinde hem de tedavisinde daha etkili stratejilerin ortaya koyulmasına katkı sağlayacaktır.

1.1. Amaç

Bu doktora tezinin amacı, moleküler biyolojik olarak alt mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış olan mikozis fungoides hastalarında Toll-benzeri reseptörler sinyal yolağı ve bunlarla ilişkili sinyal yolları arasında nasıl bir ilişkinin olduğunun belirlenmesi için tüm Toll-benzeri reseptörlerin ve bu sinyal iletiminde rol alan genlerin ve miRNA'lar ile downstreamindeki hedef genlerin ekspresyon profillerinin değişimini belirleyerek hastalığın mekanizmasındaki olası rollerini hem hasta dokuları hem de hücre kültürü üzerinden anlamaya çalışmaktır. Ayrıca T hücre klonalite çalışması ile olgulardaki klonal durumun tespiti ve klinikopatolojik veriler ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Primer Kutanöz T Hücreli Lenfomalar

Lenfomalar, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalar olmak üzere iki alt gruba ayrılmakla birlikte non-Hodgkin lenfomalar da nodal ve ektranodal olarak sınıflandırılmaktadır. Primer kutanöz lenfomalar, ektranodal lenfomaların alt tipi kabul edilmekte ve farklı klinik görünüm, immünofenotip, prognoz ve histopatoloji ile ilişkilendirilmektedir. T ve B hücrelerinden köken alan heterojen bir lenfoma grubu olan primer kutanöz lenfomalarda, lezyonlar deride başlamakla birlikte iç organlar ve lenf noduna yayılım da gösterebilmektedir. Tüm deri lenfomalarının yaklaşık %75'lik kısmını oluşturan T hücreli lenfoma grubu diğer lenfomalardan farklı yaklaşımlar gerektirmesinden dolayı dermatoloji açısından da önemli bir yere sahiptir (Bradford vd 2009, Criscione ve Weinstock 2007, Morris 2012, Pilotis vd 2007).

1997 yılında Avrupa Kanser Tedavisi Araştırma Organizasyonu (EORTC) tarafından yayınlanmış olan lenfoma sınıflandırmasında, lenfomaların moleküler, klinikopatolojik immünolojik ve sitogenetik bulguları değerlendirilerek ortaya koyulmuştur (Küçükoğlu 2006). Ancak daha sonra Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve EORTC tarafından önceden yapılan bu sınıflandırma revize edilmiş ve yeni bir sınıflandırmaya gidilmiştir. Son güncelleme ise 2018 yılında yapılmış ve bazı minör değişiklikler yapılarak yeni sınıflandırma raporu yayınlanmıştır. Kutanöz T hücreli lenfomaların sınıflandırılması Tablo 2.1'de verilmiştir. En sık karşılaşılan kutanöz T hücreli lenfoma alt tipleri mikozis fungoides ve sezary sendromdur ve batı ülkeleri için yıllık insidansı da 1/100000 olarak bildirilmiştir (Willemze vd 2019).

Tablo 2.1 2018 yılı Dünya Sağlık Örgütü ve Avrupa Kanser Tedavisi Araştırma Organizasyonu kutanöz T hücreli lenfoma sınıflandırması (Willemze vd 2019)

WHO-EORTC Sınıflandırması-2018	Frekans (%)	5 yıllık sağkalım (%)
Kutanöz T Hücreli Lenfoma (KTHL)		
Mikoizs Fungoides (MF)	39	88
Mikoizs Fungoides Varyantları		
Folikülotropik MF	5	75
Pajetoid retiküloz	<1	100
Granümatöz gevşek deri	<1	100

“Devamı arkada”

Sezary sendromu (SS)		
Erişkin T hücreli lösemi/lenfoma	<1	Veri Belirtilenmemiş
Primer kutanöz CD 30+ lenfoproliferatif bozukluklar(LPDs)		
Primer kutanöz anaplastik büyük hücreli lenfoma	8	95
Lenfomatoid papüloz (LyP)	12	99
Subkutan pannikülit benzeri T hücreli lenfoma	1	87
Ekstranodal NK/T hücreli lenfoma, nazal tip	<1	16
Kronik Aktif Epstein- Barr virüs (EBV) Enfeksiyonu	<1	Veri Belirtilenmemiş
Primer kutane periferik T hücreli lenfoma, nadir alt tipler	<1	11
Primer kutanöz γ/δ T Hücreli Lenfoma	<1	31
Primer kutane agresif epidermotropik CD8+ T hücreli lenfoma (geçici)	6	100
Primer kutanöz CD4+ küçük/orta büyüklükte T hücreli lenfoproliferatif bozukluk (geçici)	<1	100
Primer kutanöz CD8+ T hücreli lenfoma (geçici)	<1	100
Primer kutanöz periferik T hücreli Lenfoma (Aksi belirtilmemiş)	2	15
Kutanöz B Hücreli Lenfoma (KBHL)		
Primer kutane marjinal zon B hücreli lenfoma	9	99
Primer kutane foliküler merkez hücreli lenfoma	12	95
Primer kutane difüz büyük B hücreli lenfoma, bacak tipi	4	56
Epstein- Barr virüs (EBV)+ mukokutanöz ülser (geçici)	<1	100
İntravasküler büyük B hücreli lenfoma	<1	7

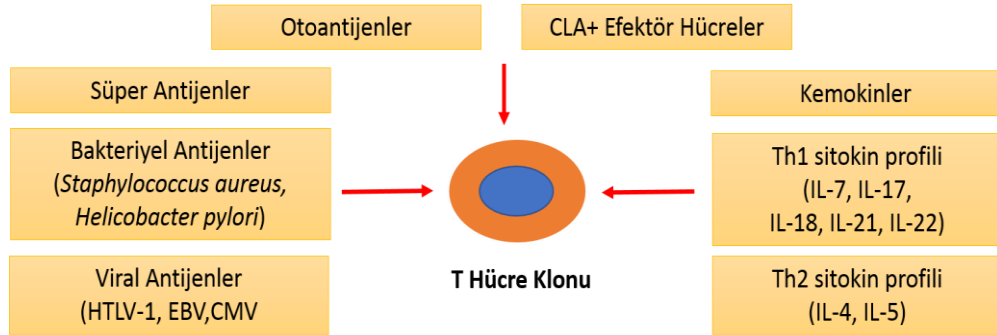
2.2. Mikozis Fungoides

2.2.1. Tanım ve Epidemiyoloji

Mikozis Fungoides en sık karşılaşılan primer kutanöz lenfoma tipidir. Non-Hodgkin lenfoma lenfomalar'ın %1'inden azını oluşturan MF, kutanöz T lenfomaların %60'ını ve tüm primer kutanöz lenfomalarında %50'sini kapsamaktadır (Yamashita vd 2012). MF ilk olarak, 1806 yılında Fransız hekim Alibert tarafından keşfedilmiş ve hastalığın terminal evresindeki mantara benzer görünüm sebebiyle bu isimle tanımlanmıştır. Klinik olarak kronik ve yavaş ilerleyen bir hastalık olan MF genellikle CD4 (+) yardımcı T hücrelerinden köken almakla birlikte yama, plak, tümör ve eritrodermi evreleri olmak üzere dört evrede izlenen bir hastalıktır. Prognoz, uzun süreli sağkalımdan hızlı ilerleyen ölümcül sonuçlara kadar değişiklik gösterebilmektedir (Kim-James ve Heffernan 2001). MF tipik olarak ortalama 55–60 yaşında tanı alan erişkinleri etkilemekle birlikte erkek-kadın görülme oranı 1,6-2:1 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca çocukluk çağında veya adölesan dönemde de görülebilmektedir. (Denis vd 2019, Olsen vd 2007). İnsidans 1995'ten bu yana stabil olarak seyretmektedir. Yıllık insidansı 0.3-1/100.000 olarak bildirilmiştir. Zencilerdeki görülme sıklığı beyaz ırka oranla daha fazladır ve Asya popülasyonlarında daha az rastlanır (Trautinger vd 2017, James vd 2008).

2.2.2. Etiyoloji ve Patogenez

Çeşitli genetik, çevresel ve immünolojik bazı faktörlerin (Şekil 2.1) mikozis fungoides etyopatogenezinde, gelişimi ve progresyonunda rol aldığı düşünülmekle birlikte etyopatogenezini tam olarak aydınlatılamamıştır (Schmidt vd 2006, Sokołowska-Wojdyło vd 2015). Yapılan çalışmalarla ortaya koyulan veriler ışığında ileri sürülen hipotezlerden birisinde, sitogenetik değişimler sonucunda sürekli bir antijenik stimülasyon ile MF gelişiminin tetiklenmesi durumunun malign T hücreli fenotipin ortaya çıkmasında rol aldığı öne sürülmüştür. Diğer bir hipotezde ise, viral ajanların uyarısına bağlı olarak T hücrelerdeki malign transformasyonlar ve sürekli viral antijenik stimülasyonun MF gelişiminde rol oynadığı belirtilmiştir (Querfeld vd 2019, Schmidt vd 2006).



Şekil 2.1 Mikozis *Fungoides* patogenezinde etkili olan faktörler (Sokolowska-Wojdylo vd 2015' den modifiye edilmiştir)

Genetik Faktörler:

Literatürde MF'e genetik yatkınlık ve ailevi geçişle ilgili de çok az araştırma bulunmaktadır. İlk ailesel MF olgusu bir anne ve kızında bildirilmiş olup daha sonra literatüre geçen ailesel MF olguları bulunmaktadır (Hodak vd 2005, WILE ve KNERLER 1938). MF etiyolojisine yönelik olarak insan lökosit antijenleri (HLA) üzerine yapılan araştırmalar bulunmaktadır. İsrail popülasyonunda yapılan bir çalışmada insan lökosit antijeni (HLA) klas-2 HLADRB1*11 ve –DQB1*03 allel sıklığının normal popülasyona oranla daha sık tespit edilmesi ile bazı genetik faktörlerin bu MF etyopatogenezinde ve gelişiminde rol oynayabileceğini ortaya koymuşlardır (Hodak vd 2005).

Onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA tamiri ile ilişkili olan genlerdeki mutasyonlar da tümör gelişiminde rol oynamaktadır. Genetik yapısında değişiklikler meydana gelen lenfositlerde viral ya da başka bir antijen tarafından uyarım sonucunda kontrolsüz hücre bölünmesi gerçekleşebilmektedir. Ayrıca mutasyonlar sonucunda hücre bölünmesinin kontrolden çıkması ve programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptoz mekanizmasının işlemelememesi gibi durumlarla birlikte anormal yapılı lenfositlerdeki kontrolsüz proliferasyon artışı primer T hücreli lenfoma gelişimini başlatabilmektedir. Yapılan bir çalışmada primer kutanöz hücreli lenfomada bu durum bcl-2 protein ekspresyonundaki artış ile ilişkilendirilmiştir (Mao vd 2004). Ayrıca hücre döngüsünün regülasyonunda görev alan p15 ve p16 genlerinde meydana gelen mutasyonlar ya da kayıpların MF hastalarındaki lezyonların tedaviye direnç ya da progresyon gösterme ihtimallerinin diğerlerine nazaran daha fazla olduğunu rapor edilmiştir (Navas vd 2000, Scarisbrick vd 2002). MF hastalarında yapılan bir diğer çalışmada p16 (*CDKN2a*) mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiş ve bu durumun MF patogenezinde rol oynayabileceğine dikkat çekilmiştir (Peris vd 1999). Primer kutanöz T hücreli lenfomada yapılan bir diğer araştırma sonucunda erken ve geç evre MF hastalarında NAV3 genindeki delesyon ve translokasyonlarda anlamlı düzeyde

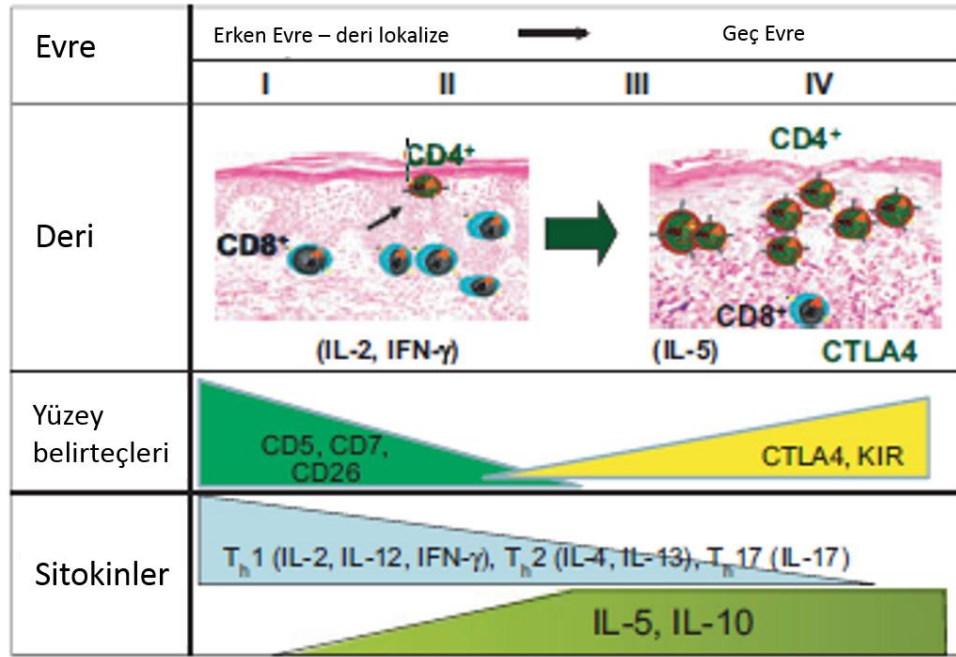
farklılık tespit edilmiştir. Erken evre MF hastalarındaki artmış NAV3 gen delesyonunun MF teşhisinde yeni bir belirteç olabileceğini ve kompleks kutanöz T hücreli lenfoma patogeneğinde rol oynayabileceğini rapor edilmiştir (Karenko vd 2005). Yapılan bir diğer araştırmada ortaya koyulan rapora göre kutanöz T hücreli lenfoma patogeneğinde rol oynadığı düşünülen ve belirlenen genlerin ekspresyon değişimleri ve birbiri ile olan etkileşimleri gösterilmiştir (Şekil 2.2) (Dulmage ve Geskin 2013).

Virüsler:

Virüslerin bazı hematolojik hastalıklardaki etiyolojik rollerinin bilinmesi MF etyopatogeneğinde de rol alabileceğini düşündürmüştü ve bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda beş virüs çeşidinin üzerinde durulmuştur. Bunlar, özellikle insan T lenfotropik virüs (HTLV) başta olmak üzere, herpes simpleks virüs (HSV), insan herpes virüs 6, (HHV), Epstein-Barr virüs (EBV) ve insan immün yetmezlik virüsüdür. Elde edilen sonuçlar virüslerin primer etyolojik faktör olmaktan çok kutanöz T hücreli lenfomada immunsupresyona ve tümör gelişimine sebep olan ikincil faktör olarak rol aldığını ortaya koymaktadır (Kim-James ve Heffernan 2001, Schmidt vd 2006, Zucker-Franklin ve Pancake 1994).

İmmunolojik Faktörler:

MF olguları ile yapılan çalışmalarda deri immünitesinin farklı düzeylerde değiştiği durumlarda biyolojik tedaviler ile dengenin tekrar kurulduğu ve konağın kendi antitümöral cevabı ile hastalığın kontrol altına alındığı ortaya konulmuştur (Naji vd 2001). Neoplastik T hücreleri bellek tipi helper (yardımcı) T hücrelerinin CD3+, CD4+, CD45RO+, CD8- karaktere sahip fenotipin özelliklerini sergiler. Ayrıca nadiren CD4-, CD8+ karakterine sahip matür sitotoksik T hücre fenotipik özelliği de sergilenebilmektedir (Willemze vd 2005).



Şekil 2.3 Erken ve geç evre MF/SS'de sitokin ekspresyonlarının hücresel değişimi (Wong vd 2011' den modifiye edilmiştir)

Cevresel Faktörler

Radyasyon, güneş ışınları, deterjan, dezenfektan, zehirli maddeler ve hava kirliliği gibi çevresel ve endüstriyel bazı ürünlerin kutanöz T hücreli lenfoma gelişimi ve kronik antijen uyarımı ile ilişkili olabileceği rapor edilmiş olmakla birlikte kapsamlı ve teyit edilmiş vaka kapsamlı çalışmalar ile desteklenmemiştir (Kotz vd 2003).

2.2.3. Klinik

Esas olarak deride lenfotik proliferasyon gösteren fakat ileri evrede zamanla lenf nodu, kemik iliği ve iç organlara yayılabilen gösterebilen MF yavaş seyirli bir kutanöz T hücreli lenfoma tipidir. Genellikle gövde, kalça, aksilla, ekstremitte proksimaleri gibi güneş görmeyen alanlarda oluşan lezyonlarla karakterize olan klasik Alibert-Bazin MF tipi, klinik olarak dört ana evrede izlenmektedir. Bunlar yama, plak, tümör ve eritrodermi evreleridir. Bunların dışında atipik belirti gösteren farklı patoloji ve farklı klinik seyirle izlenen farklı alt klinik formları da bulunmaktadır (Ferahbaş 2007).

a) Yama Evresi

MF'in ilk başlangıç evresini oluşturan ve genellikle güneş görmeyen kısımları başta olmak üzere vücudun çeşitli yerlerinde yerleşim gösterebilen lezyonların olduğu evredir. Genital bölge ve mukozalarda pek tutulum olmamakla birlikte meme, gövde ekstremitte üst kısımları sık lezyon görülen alanlardır. Değişen şiddette kaşıntı varlığı

gözlemlenebilir. Klinik açıdan seyri yavaş olan bu evrede düzensiz olan lezyonlar, yaklaşık 2-3 cm ile 10-15 cm veya daha geniş çaplarda, eritematöz ve hafif skuamli şeklinde görülür. Ayrıca lezyonlarda T lenfosit monoklonalitesinin varlığı da yapılan moleküler çalışmalarla gösterilmiştir. (Latkowski vd 2003, Cerroni vd 2004, Baykal 2004).

b) Plak Evresi

Plak evresi, yama döneminden uzun zaman sonra, lezyonlar doğrudan yama tarzı lezyonların üstünde ya da yama tarzı lezyonların zamanla derinde infiltrate olması şeklinde başlayabileceği gibi direkt olarak deriden *de novo* olarak da gelişebilmektedir. Plak evresi lezyonları oldukça keskin sınırlı, deriden hafif kabarık şekilde kahverengi kırmızı renkli düz veya egzamatize yüzeyle ve sıklıkla büyük ve asimetrik yapıda olabilmektedir. Plaklar erken evrede vücudun %10'undan azında sınırlı olmakla birlikte geç evrede daha yaygın olabilmekte vücudun baş, boyun ve ekstremitelerinde durumlarda sık tutulum gözlemlenebilmektedir (Cerroni vd 2004, Baykal 2004, Keehn vd 2007).

c) Tümör Evresi

Yama ve plak evresine nazaran daha nadir görülen tümör evresi farklı büyüklük ve şekillerdeki nodüllerle karakterize olup bu nodüller eski yama ve plak tipi lezyonların üzerinde veya doğrudan sağlam deri üzerinden çıkabilmektedir. Vücudun her yerinde ortaya çıkabilmekte ve diğer deri lenfomalarından farklı olarak beraberlerindeki rezidüel yama ve plaklardan dolayı farklılık göstermektedir. 1 cm veya daha büyük çaplarda olabilen lezyonların rengi morumsu kırmızı veya kırmızı kahverengi şeklindedir. Lezyonlar yarım küre şeklinde veya hastalığın isminin de ortaya çıkmasında kullanılan mantar şeklindedir. (Cerroni vd 2004, Baykal 2004, Keehn vd 2007). Hastalığın ileri evrede olduğunun, kötü prognozun ve tedaviye direncin de habercisi olarak kabul edilmekte olan bu evrede, klinik, histolojik ve immünolojik incelemeler de oldukça önemlidir. Bu evrede bulunan hastaların lenf nodu ve iç organlardaki tutulumu ilerlemiş olup ayrıca beraberinde sekonder olarak bakteriyel infeksiyonlar ve sepsis komplikasyonları da görülebilir. Hastaların yarısının *Stafilococcus aureus* ve *Pseudomonas aureginosa* ya bağlı sepsislerden kaybedilebildiği ve ortalama yaşam süresinin 11-36 ay olduğu rapor edilmiştir (Fung vd 2002, , Baykal 2004, Ferahbaş 2007, Keehn vd 2007).

d) Eritrodermi Evresi

Doğrudan başlayabileceği gibi daha önceki MF lezyonlarının progresyonu sonucu olarak da başlayabilmekte ve nadiren görülmektedir. MF tanısı konmuş ve takipte olan

eritrodermi gelişen hastalar eritrodermik MF olarak adlandırılır. Eritrodermik MF’te dermatopatoloji oldukça değişken olup vücudun %80’inden fazlasında kırmızı parlak, eritem ve skuamla kaplı olup simetrik olarak sağlam deri adacıkları gözlemlenmektedir (Kotz vd 2003, Vonderheid 2006, Ferahbaş 2007).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla MF’in çok sayıda deri hastalığını taklit ettiği ve özellikle de erken lezyonlarının dermatozlar ile karıştırılabileceği ve bu nedenle güçlü bir klinikopatoloji ile tanı koyulabileceği rapor edilmiştir. Klasik Alibert-Bazin tipi dışında MF’in farklı klinikopatolojik özellikler ile atipik deri belirtileri gösteren farklı klinik formları gözlemlenebilmesi nedeniyle bu farklı tipler WHO-EORTC sınıflandırmasında MF’in klinik varyantları olarak kabul edilmektedir. Bunlardan en sık karşılaşılan MF varyantları; “Vezikülo-büllöz MF, Syringotropik/Adneksotropik MF, Hipopigmente MF, Hiperpigmente MF Palmoplantar MF, Poikilodermik MF, Hiperkeratotik/Verrüköz MF, Vegetatif/Papillomatöz MF, Pigmente purpura benzeri MF, Püstüler MF ve İktiyoziform MF” olarak adlandırılmaktadır. Mikozis fungoidesin klinik ve patolojik farklılıklara sahip subtipleri de “Folikülotropik MF, Pagetoid retikülozis, Granulomatöz MF, Granulomatöz Gevsek Deri Sendromu” olarak sınıflandırılmaktadır (Ferahbaş 2007).

2.2.4. Prognoz

MF, uzun sağkalım aralığına sahip olan bir malign lenfoma tipi olup hastalığın prognozunda hastalığın evresi, başlangıç yaşı, lezyonların derideki karakteri ve tipi, lezyonların deride ve deri dışındaki tutulumları ve yaygınlığı gibi parametreler rol oynamaktadır. Ayrıca hastalığın sepsis ve diğer ağır enfeksiyonlar gibi komplikasyonlarla seyretmesi durumunda agresif bir seyir gözlemlenmektedir. (Kim vd 2003, Rein Willemze vd 2019). MF’te klinik seyir oldukça değişken olmakla birlikte bazen hastalığın seyrinde spontan gerilemelerinde olduğu da rapor edilmiştir. WHO-EORTC 2018 MF raporunda 5 yıllık sağ kalım sonuçlarının %88 düzeylerinde olduğunu bildirmişlerdir (Tablo:1). Yama ve plak evrelerindeki hastaların sağ kalım süreleri daha uzun olmakla birlikte deri dışı tutulumun olduğu ektranodal T hücreli lenfomalarda 5 yıllık sağ kalım yüzde 50’nin oldukça altında kalmaktadır (Willemze vd 2019).

2.2.5. Tanı

MF çok uzun tarihe dayanan bilgi birikimi ve iyi çalışılmış olan klinik özelliklerinin bilinmesine rağmen, birçok dermatozu taklit edebilmesi ve mikozis fungoides lezyonlarını tanımlayan spesifik histopatolojik paternin olmaması gibi durumlar nedeniyle tanıya ulaşılmasında oldukça dikkat gerektiren, patolog, onkolog ve dermatologlar tarafından multidisipliner bir çalışma ve ortak inceleme ile tanısı koyulabilecek karmaşık

bir hastalıktır. Hastalığın tanısı klinik, histopatolojik, immunogenetik, flow sitometri ve T hücre reseptörü gen rearranjmanı gibi moleküler biyolojik yöntemleri de içeren çeşitli testlerin bir araya getirilip klinikopatolojik korelasyonu sonucu ortaya koyulur (Keehn vd 2007).

Histopatoloji, tanı için altın standart olarak kabul edilmekle birlikte erken evredeki tanı koyma sıkıntılarını nedeniyle, epidermis yüzeyini arttırmak amacıyla punch biyopsi yerine insizyonel biyopsilerin alınması da tercih edilebilir. Ayrıca, klinik şüphenin devam edip histopatoloji ile kesin sonuç verilemeyen durumlarda, 3 veya 6 aylık aralıklarla deri biyopsileri alınıp takibinin yapılması da tanı koymada uygulanan ve yapılması gereken metotlardır (Kazakov vd 2004, Erkin 2004). Ayrıca histopatoloji ile kesin tanı koyulamamış durumlarda t hücre reseptör gen rearranjmanı çalışması PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı olarak parafin bloklardan veya taze veya donmuş dokulardan derideki infiltre T hücrelerin monoklonal ve poliklonal karakterli olup olmadığını da ortaya koyarak skorlama ve tanıda yardımcı yöntem olarak kullanılmaktadır (Erkin 2004).

2.2.5.1. Histopatoloji, İmmunofenotip ve Moleküler Teknikler

Mikozis fungoides hastalığında farklı şiddette papiller dermiste lenfosit infiltrasyonunun olduğu ve bu hücrelerin epidermise ilerlediği bilinmektedir. Histopatoloji sonuçları lezyonların klinik evresine göre farklılık gösterebilmekle birlikte, klasik MF'te dermisteki lenfosit infiltrasyonu, epidermal tabakadaki atipik lenfosit infiltrasyonu veya "Pautrier mikroabseleri" olarak adlandırılan atipik lenfositlerin epidermal tabakadaki ekzositozuna bağlı kümelenmesi durumları beklenen histopatolojik bulgular olarak karşımıza çıkmaktadır (Guitart vd 2001, Smoller vd 1995).

İmmunfenotiplendirme için lenfoid antijen ekspresyonlarının hücre veya dokulardaki monoklonal antikorlar yardımıyla tespiti tanıda yardımcı olan immunohistokimyasal bulgular için çoğu olguda, malign karaktere sahip hücrelerin hafıza T hücre fenotipine (CD3+, CD4+, CD8-) ve az sayıdaki olgu için ise, sitotoksik T hücre fenotipik (CD3+, CD4-, CD8+) ve CD4-, CD8- özelliklerinin taşındığı saptanmıştır. Erken dönem MF için, lenfositlerin immunofenotipik farklılıklarının oluşmamasına veya bazen geç evre MF hastalarındaki T hücre ekspresyonlarının kaybı gibi sebeplerle immunohistokimyasal bulguların tanıya yardımcı olamayacağı durumlar için immunofenotipleme ve T hücre klonalite tespitinden yararlanır (Florell vd 2006, Hodak vd 2006, Whittam vd 2000).

Bir diğer tanı koymada yardımcı olarak kullanılan yöntem, T hücre klonalitesinin moleküler biyolojik teknikler ile çalışılmasıdır. Yapılan kapsamlı bir kutanöz T hücreli lenfoma tanısı almış (mikozis fungoides/ Sezary Sendrome) hasta popülasyonuna sahip

bir araştırmada, hastalara ait biyopsi örneklerinde multipleks polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ile yapılan çalışmada T hücre klonalitesi ve klonal karakter tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre, multipl PCR ve heterodupleks analizinin, KTHL hastalarında %92,7 gibi bir oranla yüksek tanısal hassasiyetle ilişkilendirilmiştir. Klonal bir T hücresindeki gen yeniden düzenlenmesinin bulunması, MF deri skoru, immunofenotipleme ve histolojik paternle de yakından ilişkili bulunmuştur (R Ponti vd 2005). T ve B hücre klonalite çalışmalarında daha eskilerde Southern blot ve günümüzde polimeraz zincir reaksiyonu ve takiben hererodupleks analizi kullanılmaktadır. Kaliteli DNA izolasyonu yapılmış biyopsi materyalinde ya da parafin bloktan baskın klonal T hücre popülasyonu bu yöntemler yardımıyla kolayca belirlenebilmektedir (Galper vd 2010, Hagedorn ve Kiefer 1977, Onsun vd y.y., Shapiro vd 1987, Simon 1987). Bu yöntemlere ek olarak tanıda yardımcı olabilecek DNA sitometri, nükleer morfometre ve kromozomal çalışmalar da kullanılıyor olsa da rutinde ülkemizde immünohistokimyasal analizler dışındaki diğer yöntemler çok sık kullanılmamaktadır (Galper vd 2010, Hagedorn ve Kiefer 1977, Shapiro vd 1987, Simon 1987). Bu yöntemlerin toplu değerlendirilip skora çalışması yapılarak da tanı koyma işlemleri gerçekleştirilmektedir (Onsun 2007).

2.2.6. Evreleme

Mikozis fungoides için çok çeşitli evreleme sistemleri ortaya koyulmuş olmakla birlikte Bunn ve arkadaşları tarafından geliştirilen evreleme sistemi bunların içindeki en basit ve kabul gören sistemdir. Bu evreleme sistemi TNM yani “tümörnod-metastas” olarak adlandırılmıştır. Bu sistem zaman içinde periferik kan değerliklerini içerecek şekilde revizyon ve modifikasyonlara uğrayarak TNMB sistemi olarak güncellenmiştir (Bunn ve Lamberg 1979, Hwang vd 2008). Bu evreleme sisteminin kabul gören hali Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2 Mikozis fungoidesin TNBM sınıflaması (Bunn ve Lamberg 1979, Onsun 2007)

Deri tutulumu (T)
T₀: Klinik ve/veya histopatolojik olarak şüpheli bulunan lezyon
T₁: Sınırlı plak, papül ya da yamalar (Deri yüzeyinin<%10)
T₂: Yaygın plak, papül ya da yamalar (Deri yüzeyinin>%10)
T₃: Tümörler
T₄: Eritrodermi
Lenf Nodu tutulumu (N)
N₀: Lenf nodu klinik olarak tutulmamış ve histoloji normal
N₁: Lenf nodu klinik olarak tutulmuş ve histoloji normal
N₂: Lenf nodu klinik olarak tutulmamış ve histoloji MF

N₃: Lenf nodu klinik olarak tutulmuş ve histoloji MF
İç organ tutulumu (M)
M₀: Yok
M₁: Var (Patolojik tanı koyulmuş)
Periferik Kan tutulumu (B)
B₀: Periferik kanda atipik hücre sayısı <%5 (Sezary yok)
B₁: Periferik kanda atipik hücre sayısı > %5 (Sezary var)

2007 yılında ISCL (Uluslararası Kutanöz Lenfomalar Derneği) ve EORTC (Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü) tarafından güncellemesi yapılan kutanöz Non-Hodgkin lenfomalar evrelemedesinde, lezyonlu hastalardaki yaşam süresi lezyon tipi, plak ve yama evreleri, tedavi seçimi ve T hücre klonalitesi değerlendirilmesi gibi kriterler de eklenerek son şekli verilmiş olup günümüzde de hala geçerliliğini korumakta olan bu evreleme sistemi (Tablo 2.3) kullanılmaya başlamıştır (Olsen vd 2007).

Tablo 2.3 MF ve SS'de güncel ISCL/EORTC sınıflaması (Olsen vd 2007)

Deri Tutulumu	
T1	Cilt yüzeyinin % 10'unundan azını kaplayan sınırlı yamalar*, papüller ve / veya plaklar.(T1a (sadece yama) ve T1b (plak ± yama))
T2	Cilt yüzeyinin%10'unu kaplayan yamalar, papüller veya plaklar. Ayrıca T2a (sadece yama) ile T2b (plak yama) arasında sınıflandırılabilir.
T3	Bir ya da daha fazla tümör (≥1 cm çap)
T4	%80 vücut yüzey alanını kaplayan eritrodermi
Lenf Nodu tutulumu	
N0	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu yok, biyopsisi gerekli değildir
N1	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu, histopatoloji Dutch** evre 1 NCI veya LN0-2
N1a	Negatif Klon
N1b	Pozitif Klon
N2	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu; histopatoloji Dutch** evre 2 veya NCI LN3
N3	Klinik olarak anormal periferik lenf nodu; histopatoloji Dutch** 3-4. veya NCI LN4; klon pozitif veya negatif

N4	Klinik olarak anormal periferik lenf düğümleri; histolojik teyit yok
İç Organ Tutulum	
M0	İç organ tutulumu yok
M1	İç organ tutulumu var (patoloji raporu olmalı ve tutulumun olduğu organ spesifik olarak belirtilmelidir)
Periferik Kan Tutulumu	
B0	Belirgin kan tutulumunun yokluğu: Periferik kan lenfositlerinin%5'i atipik (Sézary) hücrelerdir.
B0a	Negatif Klon
B0b	Pozitif Klon
B1	Düşük kan tümör yükü: Periferik kan lenfositlerinin%5'i atipik (Sezary) hücrelerdir ancak B2 kriterlerini karşılamamaktadır
B1a	Negatif Klon
B1b	Pozitif Klon
B2	Yüksek kan tümör yükü: $\geq 1000/\mu\text{L}$ Sezary hücresi, pozitif klon*

* Polimeraz zincir reaksiyonu ya da Southern blot tekniği ile belirlenen t hücre klonu

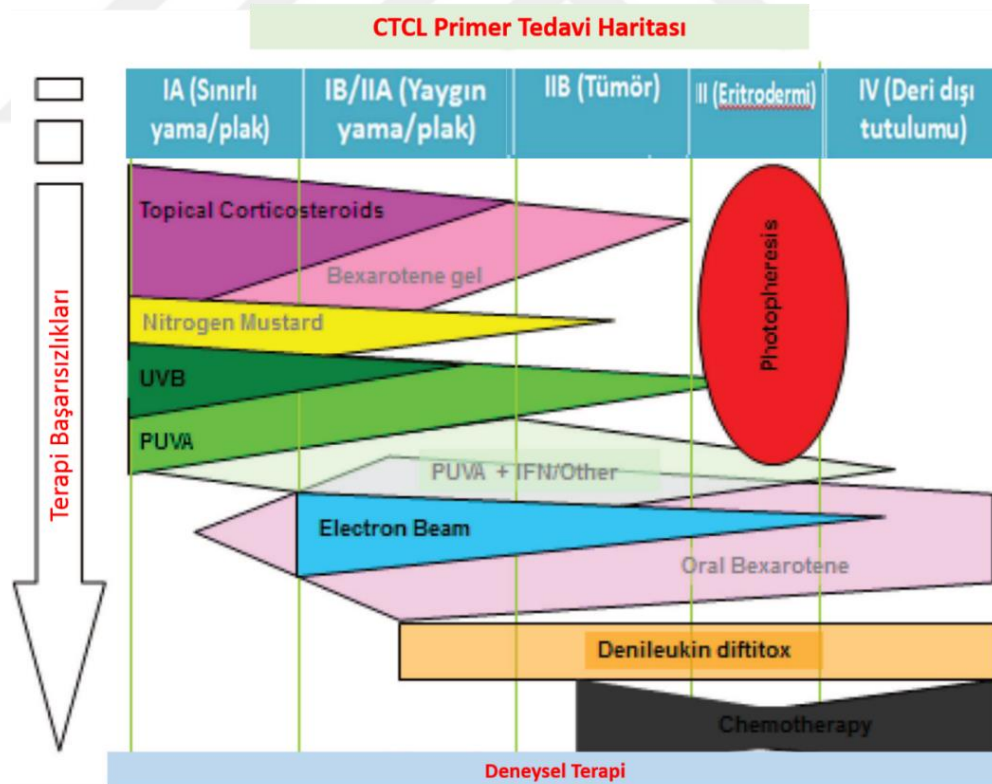
** Dutch evreleme: Mikozis fungoides ve Sezary sendromunda histolojik olarak lenf nodunun dört evreli olarak sınıflaması

2.2.7. Tedavi

MF tedavisinde temel amaçlar, sağ kalımın artırılması, en az yan etki ile yaşam kalitesinde iyileşme ve semptomlarda gerilemelerin sağlanması olmakla birlikte tam anlamıyla iyileşmenin olduğu bir tedavi bulunmamakta ve remisyon sağlanabilse bile MF nükslerle de seyredebilmektedir. Evre, lezyon tipi, yaş, klinik belirtiler, hastanın genel durumu gibi çeşitli parametreler tedavi seçimi için önem arz etmektedir. MF hastalarında, deride meydana gelen lezyonlar tam olarak baskılanamasa ve diğer agresif neoplazilerle karşılaştırıldığında iyileşme tam anlamıyla sağlanamasa bile hastalığın kontrol altında tutulup oluşabilecek enfeksiyonlara mâni olmak ve her türlü yan etkiyi engellemek iyi prognoz belirtileri olarak değerlendirilmektedir (Kaye vd 1989, Li vd 2012, 2012, McFarlane vd 2005, Whittaker vd 2003). MF tedavisinde kullanılan çeşitli ilaçlar olmakla birlikte daha efektif sonuç veren ilaçların geliştirilebilmesini sağlamak üzerine yeni araştırmalar yapılmaktadır (Oka ve Miyagaki 2019). Yapılan tedaviler kapsamında hastalığın progresyonunun ne kadar baskılandığının tam olarak ortaya koyulamaması

gibi durumlar hastalığın net tedavi başarısının oranının ve bu alandaki algoritmaların tespitinin yapılmasını güçleştirmektedir. İdeal tedavinin ortaya koyulmasında dermatologlar, onkologlar ve patoloğlar arasındaki iş birliği ve yakın iletişimin güçlü olması önem arz etmektedir (Kaye vd 1989, McFarlane vd 2005, Onsun 2007).

MF tedavisinde deriyi hedef alan tedaviler, sistemik tedaviler ve biyolojik ajan düzenleyiciler olmak üzere üç tedavi protokolü vardır. Tek ajanın ortaya koyduğu toksik etkiyi azaltmak amacıyla çeşitli ajanların çoklu ve kombine şekilde sinerjistik etkilerini içeren tedaviler de MF tedavisi için önerilmektedir. Deriyi hedef alan tedavi kapsamında uygulanan tedavi yöntemleri; "Topikal Steroid, Topikal kemoterapi (nitrojen mustard ve karmustin), Topikal etinoid (bexaroten), Foto(kemo)terapi, Topikal imiquimod, Radyoterapi ve Fotodinamik tedavi" şeklindedir. Biyolojik cevap düzenleyiciler kapsamında uygulanan tedavi ajanları; "İnterferonlar, Retinoidler, Denilökin Diftitoks (Dab389ıl-2), Ekstrakorporeal Fotoferez (EKF), Vorinostat" ile "Alemtuzumab ve Allojenik Kemik İligi Nakli" de uygulanmaktadır(Tefferi ve Wilcox 2016, Taşlıdere 2010). Duvic tarafından oluşturulan, Şekil 2.4'te verilmiş olan KTHL Primer Tedavi Haritası evreye göre tedavi seçeneklerini içeren bir dizi basamaklar özetlenmiştir (Duvic 2015).



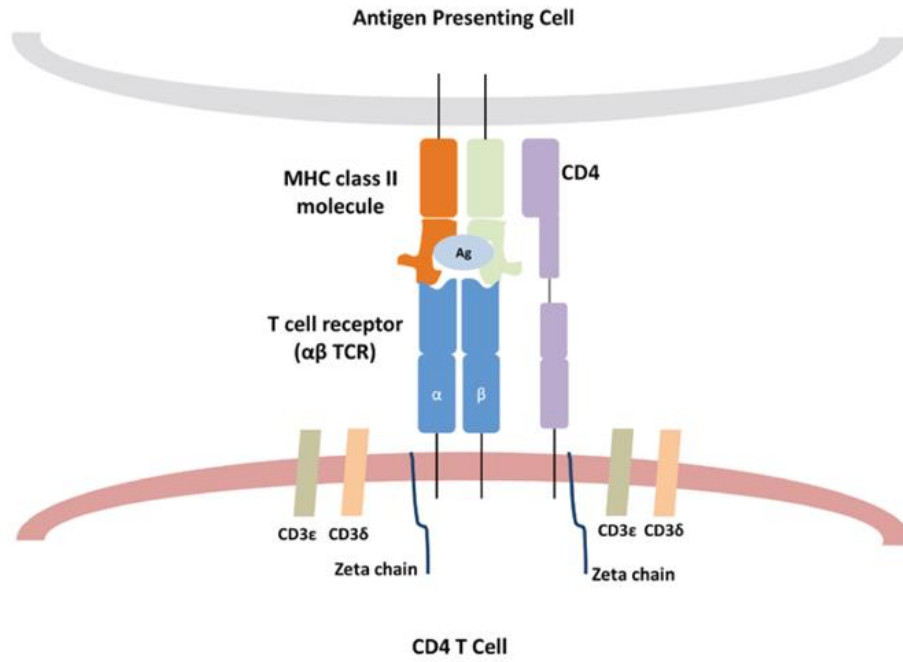
Şekil 2.4 KTHL evrelere göre primer tedavi haritası (Duvic 2015'den modifiye edilmiştir)

2.3. T Hücre Reseptörü (THR) ve Klonalite

2.3.1. T Hücre Reseptörü: Yapı ve Fonksiyonları

T ve B hücreleri immün sistemde görevli olup aynı zamanda lenfoproliferatif kökenli hastalıkların ortaya çıkmasında da rol oynayan temel hücrelerdir. Bu hücreler yüzeylerinde immun fonksiyonun yerine getirilmesinde rol oynayan T hücre reseptörü (THR) ve immunoglobülin (Ig) reseptörlerini taşımaktadırlar. Timusta olgunluğa ulaşan lenfositler taşıdıkları yüzey markerleri ile CD4+ T helper (yardımcı) tip ve CD5+/CD8+ T-sitotoksik/ T supresor karakterlerini kazanarak periferik kan ve lenfoid sisteme katılırlar. Şekil 2.5'te gösterildiği gibi T hücreleri taşıdıkları T hücre reseptörü ve antijen sunan hücredeki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile yabancı antijenleri tanımaktadır (Çakıroğlu ve Anadolu 1999).

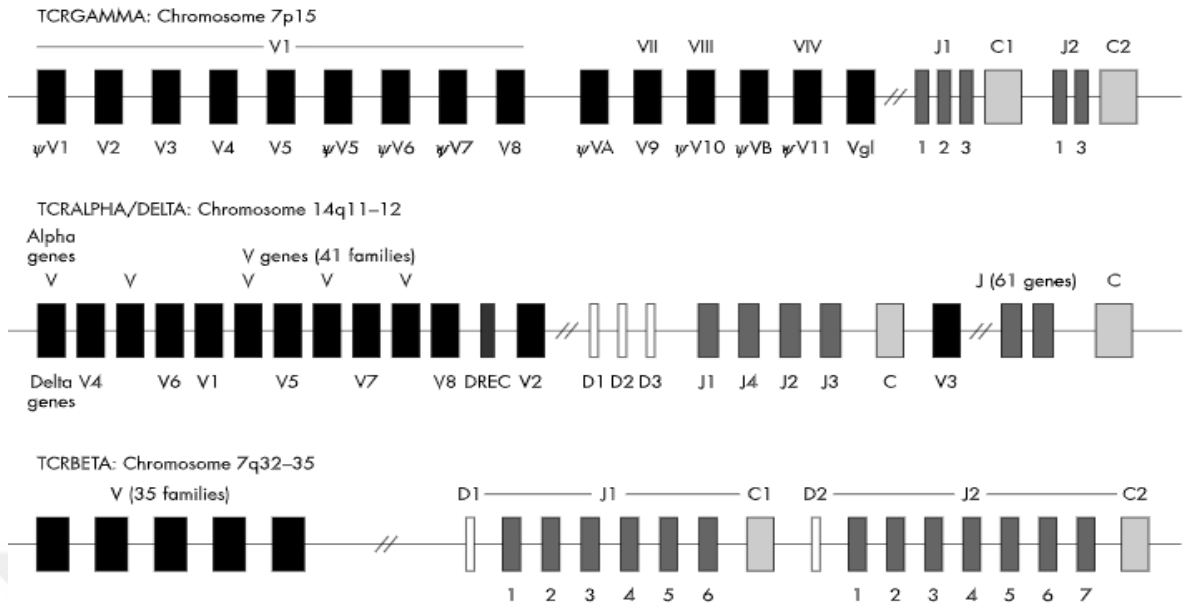
İnsanlarda T hücrelerin çoğu (%95) alfa (α) ve beta (β) alt ünitelerini içerirken küçük bir T hücre alt tip grubu da (doğal öldürücü sitotoksik hücrelere benzer aktivitedeki T hücrelerinin reseptörleri) gamma (γ) ve delta (δ) alt ünitelerini içermektedir. Alfa (α) alt ünitesi 40-50 kDa, beta (β) alt ünitesi 35-47 kd ağırlığında olup disülfid bağıyla membrana bağlı olarak heterodimer şeklindedir ve X-ray krsitalografisi ile yapısal karakterleri belirlenmiştir. Diğer iki alt birimden gamma (γ) ünitesi 55 kd ağırlığında ve delta (δ) ünitesi 40 kd ağırlığındadır. Yaklaşık 300 aminoasit uzunluğunda olan THR zincirinde iki temel domain bulunmaktadır. Bunlar oldukça değişken sekanslar içeren ekstrasellüler N-terminal kısım olarak bilinen değişken (variable-V) bölge ve kısa sitoplazmik kuyruk içeren yüklü transmembran kısım olarak bilinen sabit (constant-C) bölgedir (Terhune ve Cooper 1993, Çakıroğlu ve Anadolu 1999).



Şekil 2.5 Örnek olarak CD4 T hücresi kullanılarak yapılan peptit antijen MHC kompleksi ile TCR ile bağlantı şeması (Web_1)

2.3.2. T Hücre Reseptör Gen Rearranjmanı (Yeniden Düzenlenmesi)

T hücre reseptörünü kodlayan genler kromozom 7 ve kromozom 14 üzerinde lokalizedir. TCR δ (TCRD) ve TCR α (TCRA) zincirini kodlayan genler 14q11–12, de lokalize iken TCR β (TCRB) ve TCR γ (TCRG)'yı kodlayan genler de sırasıyla 7q32–35 ve 7p15'te lokalizedir. Gen segmentlerinin düzenlenmesi immunoglobülinlerdeki gibi V (değişken), D (çeşitlilik), J (birleşme) ve C (sabit) şeklindedir (Hodges vd 2003). Şekil 2.6'da T hücre reseptörü genlerinin organizasyonu gösterilmiştir. V, D ve J segmentleri antijen tanımadan somrumlu olan V domain ekzonlarını oluşturmak üzere T hücre gelişimi sırasında yeniden düzenlenerek kombinasyonu artırır. T hücresi repertuarının çeşitliliği sadece farklı V, D, J rekombinasyonlarının bir birleşimi değil aynı zamanda kavşak bölgelerinde (V-J, D-J ve V-D) nükleotid insersiyon ve delesyon işlemlerinden de kaynaklanmakta olup böylece çok çeşitli antijenlerin tanınması için çeşitliliğin artması sağlanmaktadır (Hodges vd 2003, Yoshikai vd 1985) . Tablo 2.4'te T hücre reseptör genlerinin sahip oldukları segment sayıları ve kromozomal lokalizasyon bilgileri sunulmuştur.



Şekil 2.6 T hücre reseptörü gen organizasyonu (Hodges vd 2003)

MHC (HLA) sistemi (Gulwani-Akolkar vd 1995) ve THR gen polimorfizmleri (Gomolka vd 1993) ile enfeksiyon (Soudeyns vd 2000) ve süperantijenler (Bernal vd 1999) gibi çevresel faktörleri içeren çeşitli intrinsik ve ekstrinsik faktörler insanlarda T hücre reseptör repertuarının ekspresyonel düzeylerini etkilemektedir (Hodges vd 2003).

Tablo 2.4 T hücre reseptörlerini kodlayan genler ve kromozomal organizasyon bilgileri (Hodges vd 2003)

TCR geni	Kromozom	V segmentleri	D segmentleri	J segmentleri	C segmentleri
TCRα (TCRA)	14q11-12	70	0	61	1
TCRβ (TCRB)	7q32-35	67	2	13	2
TCRγ (TCRG)	7p15	14	0	5	2
TCRδ (TCRD)	14q11-12	8	3	4	1

2.3.3. T Hücre Klonalitesi

T hücre klonalite testi, T hücre proliferasyonlarında klonal çeşitliliğin ve baskın klonun spesifik ve tekrarlanabilir şekilde değerlendirilmesine imkân tanıyan önemli klinik ve araştırma değerine sahip bir testtir. Belirli bir T hücresi antijene maruz kaldığında, TCR'lerde somatik hipermutasyon görülmez (Janeway vd 2001). Dolayısıyla, belirli bir T hücresi klonunun özgülüğü, yeniden düzenleme gerçekleştiğinde statik kalır; bu ortak antijen özgülüğü, o popülasyonun klonotipi olarak adlandırılır (Yassai vd 2009). Bir T hücre popülasyonunun klonotipi, T hücrelerin antijen özgülüğünü ve ayrıca bileşik düzenlemelerde yer alan spesifik V ve J genlerini üretmek için gereken benzersiz sekansların moleküler bir açıklamasıdır. Belirli bir T hücre klonunda dört TCR lokusunun hepsinin aşamalı olarak yeniden düzenlenmesi mümkün olduğu göz önüne alındığında, kesin THR klonotipleme, yeniden düzenlenmiş THR gen transkriptlerinin sekanslanmasını gerektirir (Mahe vd 2018). Klonalite değerlendirmesi, her zaman malignite anlamına gelmese de, bazı reaktif süreçler büyük klonal lenfosit popülasyonları içerdiğinden, malign lenfoproliferasyonların tanısında önemli bir araçtır (Groenen vd 2012, Langerak vd 2007).

Klonalitenin saptanmasının mümkün olmadığı durumlarda ya da maliyeti azaltmak amacıyla daha ucuz ve aynı zamanda moleküler hassasiyeti yüksek Southern Blotlama (SB) veya polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile klonal durumun belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmektedir (Dongen vd 2003). T hücre reseptörü ile klonalite çalışmalarının rutin olarak testlerinin başlaması 1980'li yıllara dayanmakta olup yine bu yıllarda yapılan çeşitli yayınlarla birlikte klonalite testlerinin lenfoproliferatif hastalıkların tanılmasına uygun olduğu rapor edilmiştir (Bertness vd 1985, Dosaka vd 1989). Southern blot yöntemi ile ilk başlarda klonalite çalışmalarında altın standart olarak kabul gören bir moleküler teknik olarak uzun yıllar uygulanmışsa da fazla miktarda ve yüksek kaliteli DNA molekülüne ihtiyaç duyması dolayısıyla parafin blok çalışmalarındaki yetersizliği ve sürekli olarak taze doku ve kan ile çalışmaya uygun olması, zaman alıcı ve oldukça fazla emek gerektirmesi gibi sebeplerle yerini daha kolay ve bu dezavantajları ortadan kaldıran bir yöntem olan PCR' a bırakmıştır (Dongen vd 2003). Daha yakın zamanlarda, PCR tabanlı T hücre klonalite analizlerini daha da standart hale getirmek için uluslararası kabul görmüş PCR primer setleri tanıtılmış ve rutin çalışmalarda multipleks PCR yardımıyla aynı anda çok fazla primer setinin çalışması kolaylaştırılmıştır. Zaman içinde BIOMED primer seti olarak adlandırılan PCR bazlı TCR klonalite analizinde en sık kullanılan primerler, hem immüno globülin hem de TCR klonalite değerlendirmesi için multipleks primer setlerini içermekte ve klinik laboratuvarlarda rutin test sonucunda tanı koymada yardımcı olarak kullanılmaktadır

(Dongen vd 2003, Langerak vd 2012). Yalancı pozitifliği ortadan kaldırmak amacıyla heterodupleks analizi veya Genscan analizleri yapılmaktadır. GenScan ve / veya heteroduplex analizleri ile yapılan Multipleks PCR bazlı klonalite testi ve değerlendirmesi dünya çapında bir standart haline gelmiştir (Groenen vd 2012, Matthews vd 2004).

2.3.4. Mikozis Fungoides ve T Hücre Klonalitesi

KTHL'nin klonotipik yapısının belirlenmesi klinik tanı, prognoz ve KTHL evrelemede kullanıldığı için pratik olarak önemlidir (Iyer vd 2019) . Weiss ve arkadaşları, T hücreli reseptör (TCR) gen yeniden düzenlemelerinin moleküler analizini derinin lenfoproliferatif hastalıklarına uygulayan ve MF'deki hastaların cilt ve lenf düğümlerinde klonal yeniden düzenlemeleri tarif eden ilk kişilerdir (Weiss vd 1985). Klonal T hücre popülasyonu KTHL, erişkin T hücreli lösemi / lenfoma, pityriasis lichenoides, ve aktinik retinoid (AR) ler ve küçük plak parapsoriasis gibi hastalıklarda saptanmış ve çalışılmaktadır (Qiu vd 1997). Özellikle MF için, yeniden düzenlenmiş TCR genlerinin moleküler tespiti, dermatopatik lenfoadenopati gösteren lenf nodlarında MF'nin erken tutulumunu doğrulayabilir (Iyer vd 2019, Qiu vd 1997). Son yıllarda, kutanöz lenfomlardan MF için, araştırmacılar T hücre reseptör gama ve betanın değişimine odaklanmakta ve tanı koymada ve baskın klonu tespit etmede klonal gelişimin tespitinden yararlanmaktadırlar (R Ponti vd 2005, Xu vd 2011). Yapılan çalışmalarda T hücreli lenfomaların yaklaşık %50-90'ında THR gamanın yeniden düzenlenmesinin olduğu rapor edilmiştir. MF evrelerine göre yapılan araştırmada tespit oranlarının yama fazı için% 52 -% 75, plak fazı için% 73 -% 83 ve tümör için% 90 -% 100 olduğu belirtilmiştir. Elde edilen sonuçların özellikle erken MF teşhisinde yararlı bir araç olduğu rapor edilmiştir. THR gama yeniden düzenlenmesinin THR betaya oranla daha yüksek olduğu ortaya koyulmuştur (Xu vd 2011). Marks ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer araştırmada, THR gen yeniden düzenlenmesi ile MF evreleri arasında bir ilişkinin olduğu özellikle geç MF evrelerinde V γ 1-8 bölgesinde rearanjman olduğu ortaya koyulmuştur (Marks vd 2018) . Yakın zamanda BIOMED-2 primerleri kullanılarak THR beta yeniden düzenlenmesi ile yapılan bir moleküler analiz çalışmasında kutanöz T hücreli lenfomada *J β 1* ile hastalığın şiddeti arasında bir ilişki olduğu ortaya koyulmuştur (Morgan vd 2006). Hsiao ve arkadaşları tarafından MF'yi düşündüren hasta grubu için yapılan bir çalışmada THR gama rearanjmanı ile yapılan PCR çalışmasında %71 oranında pozitiflik bulmuşlardır (P.-F. Hsiao vd 2007) .

Yapılan bu ve benzeri tüm araştırmalar sonucunda THR gen rearanjmanının KTHL tanısındaki rolü ve katkısı ortaya koyulmuştur. Bu ve yeni çıkan tekniklerle ilgili olarak özellikle rutin çalışmaların ortaya koyulmasında, moleküler biyologlar, onkologlar,

hematologlar, dermatologlar, patoloğlar ve immunologlar arasındaki yakın iletişimin, en güvenilir tanıya ulaşmak için mevcut tüm verilerin entegrasyonunun sağlanmasında önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

2.4. Toll-Benzeri Reseptörler (Toll-like Reseptörleri, TLR)

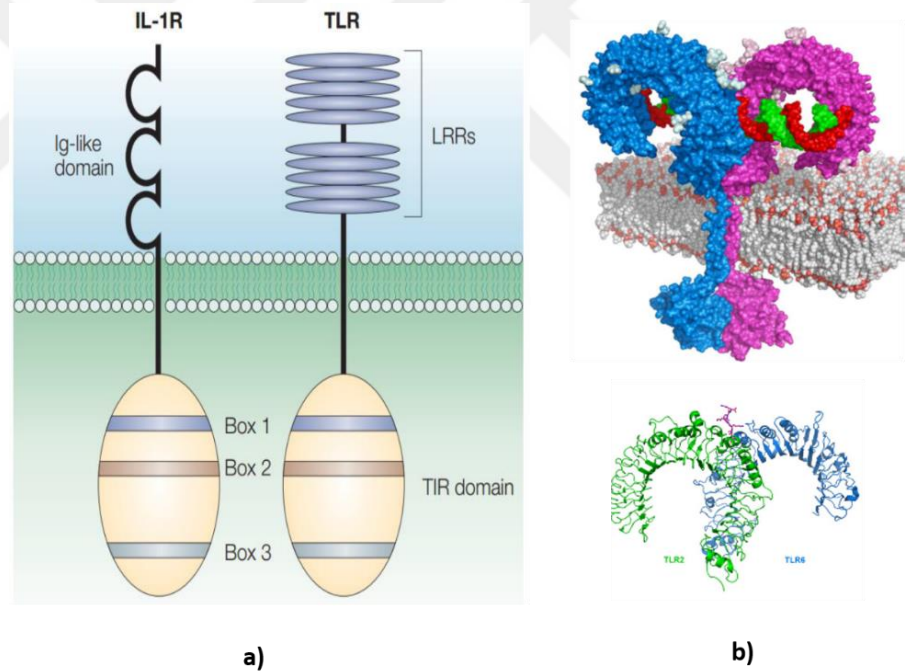
2.4.1. TLR Ailesi, Yapı, Lokalizasyon ve Özellikler

“Toll benzeri reseptör” adı, *Drosophila melanogaster* sineklerinde keşfedilen bir transmembran reseptörüne yapısal ve fonksiyonel benzerlikten türetilmiştir. *Toll*, *Drosophila* embriyonik gelişimi için bir düzenleyici gen olup, embriyonel dorsoventral ekseninin belirlenmesinden sorumludur. Yapılan ileri düzey çalışmalarda bu genin susturulması durumunda meyve sineklerinin mantar enfeksiyonuna bağlı olarak öldüğünün gözlemlenmesi üzerine bu genin anti-fungal olarak etki gösterdiği rapor edilmiştir (Lemaitre B vd 1996, Petry ve Gaspari 2009). Daha sonraki yıllarda bu genin hem omurgalılarda hem de memelilerde de keşfedilmiş ve doğal immünitede rol aldığı belirlenmiş olup doğal immünite elemanları olan makrofaj, monositler, B hücreleri ve T hücrelerinin spesifik tipleri ve dentritik hücreler gibi immün hücreleri ile miyofibroblast, adipositler gibi immün olmayan hücrelerde eksprese edilen tip I transmembran proteini olarak tanımlanmışlardır (Kundakçı ve Pirat 2012, Cario 2005).

Toll benzeri reseptörlerin üç bölümü bulunmaktadır (Şekil 2.7a) (Akira ve Takeda 2004). Bu bölümlerden birincisi, 550-980 amino asitlik ekstrasellüler bölüm olup ligand tanınmasında rol oynayan lösince zengin (LRR: leucine-rich repeats) tekrar bölgeleridir. Transmembran heliks bölümü ikinci kısmı oluştururken üçüncü bölüm de toll-like interlökin-1 (TIR) reseptör bölümü olup yaklaşık 200 aminoasitten oluşan, sinyal yollarının başlangıcı olan intraselüler kısımdır (Akira ve Takeda 2004, Takeuchi ve Akira 2002).

Bugüne kadar TLR ailesine ait fareler ve insanlarda 13 üye tespit edilmiş olup ayrı ayrı insanda 11, farelerde ise 12 TLR üyesi saptanmıştır. Bunlardan TLR 11, TLR 12 ve TLR 13 sadece farelerde eksprese edilmekte olup insanlarda eksprese edilmemektedir. Bir yada daha fazla sayıdaki mikrobiyal moleküler bağlanabilen TLR’ler hücre yüzeyi, endozom, endolizozom ve lizozom gibi hücre bileşenlerinde lokalize olup, kendileriyle homodimer yaparak etkileşim gösterebildikleri gibi koreseptörleri veya aksesuar molekülleriyle heterodimer olarak da etkileşebilirler (Botos vd 2011, Erickson vd 2008, Kawai ve Akira 2010). Ligand bağlandığında dimer yapan iki TLR’nin ekstrasellüler kısımların “m” şeklinde görüntü oluşturduğu kristallogarfi çalışmalarında ortaya koyulmuştur (Şekil 2.7b) (Botos vd 2011).

TLR'ler lokalizasyonlarına göre, hücre yüzeyi TLR'leri ve hücre içi TLR'leri olarak iki alt aileye sınıflandırılır. Hücre yüzeyi TLR'leri TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR10'u içerirken, hücre içi TLR'ler endozomda lokalize edilir ve TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 ve TLR13'ü içerir (Kawai ve Akira 2010, Kawasaki ve Kawai 2014). Hücrelerdeki ekspresyonu dinamik olan TLR için ortaya çıkan ligand spesifitesi de farklılık göstermektedir. Ortamda ligand yokken nonkovalent dimer oluşturan TLR'ler için belirli ligand tanımlamaları yapılmış olup, TLR 10, TLR 12, TLR 13 için ligandlar henüz belirlenememiş durumdadır (Erickson vd 2008, Kanzler vd 2007) . Tablo 2.5'te TLR reseptörlerinin belirlenmiş olan ekzojen ve endojen ligandları ve adaptör proteinleri ile sentezini indüklediği inflamatuvar mediatörler olan sitokin ve kemokoinler belirtilmiştir. TLR'ler spesifik olarak ilgili ekzojen ve endojen ligandlarını tanımakta ve böylece hücredeki çeşitli genlerin ekspresyon seviyelerini uyarmakta ve bunun sonucunda da doğal immunitenin aktive olmasını sağlamaktadır (Konat 2008).



Şekil 2.7 a) Toll benzeri reseptörler için tasarlanmış yapısal model (Akira ve Takeda 2004) b) TLR için dimer oluşturduğunda ortaya çıkan şematize kristallografi modeli ve TLR2 ve TLR6 dimer örneği (Botos vd 2001)

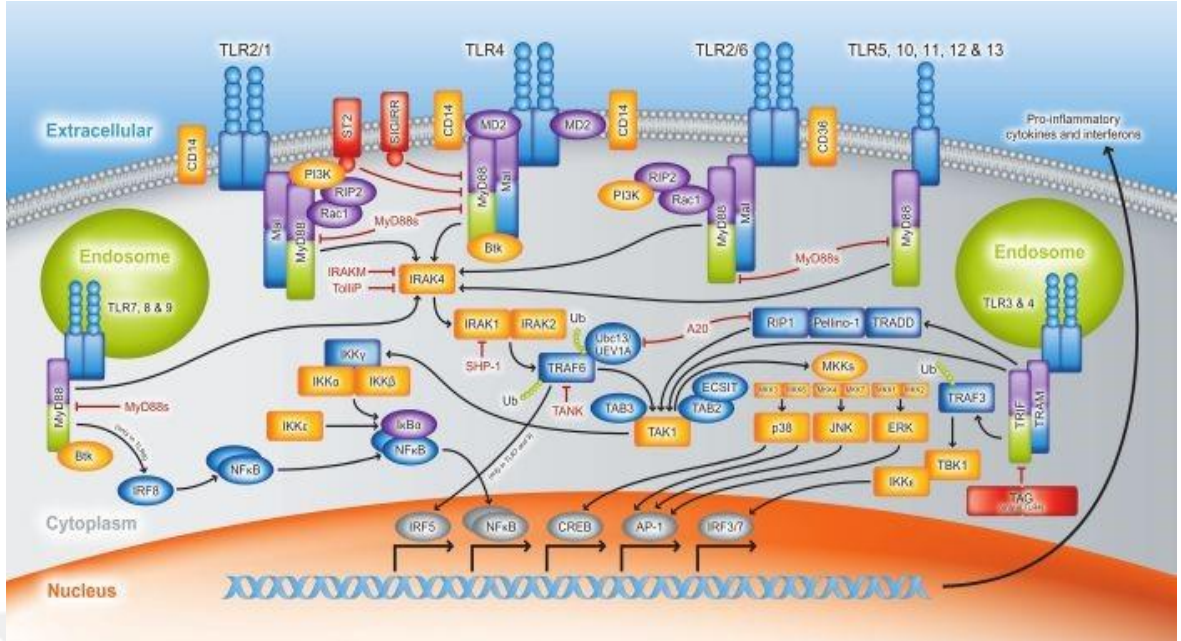
Tablo 2.5 TLR ligandları, adaptör proteinleri ve indüklediği sitokin ve kemokinler (İnci ve Pişkin 2007, Erickson vd 2008, Güven ve Can 2012)

Reseptör	Ekzojen Ligand	Endojen Lidand	Adaptör(ler)	Başlıca Sentezlenen İnflamatuvar sitokin ve kemokinler
TLR1	Triaçil lipopeptidler	-	MyD88/MAL	IL-6, IL-10, TNF-alfa
TLR2	Lipoproteinler, gram pozitif peptidoglikanlar, Lipoteikoik asitmantar, viral glikoproteinler	hsp60, hsp70, hsp96	MyD88/MAL	IL-6, IL-10, TNF-alfa, IL-1 β
TLR3	Çift zincirli RNA	mRNA	TRIF	IFN-Gama
TLR4	LPS(lipopolisakkarit), viral glikoproteinler	hsp60, hsp70, hsp96, Fibronektin EDA Domain, Fibrinojen	MyD88/MAL, TRIF, TRAM	IFN-Gama, IL-1 β
TLR5	Flagellin	-	MyD88	IL-6, IL-10, TNF-alfa,
TLR6	Diaçil liopeptidler,	-	MyD88/MAL	IL-1 β
TLR7	Tek zincirli viral RNA, küçük sentetik bileşimler	-	MyD88	IFN-Gama
TLR8	Tek zincirli viral RNA, küçük sentetik bileşimler	-	MyD88	IFN-Gama
TLR9	Metillenmemiş CpG DNA	Kromotin IgG kompleksi	MyD88	IFN-Gama
TLR10	Bilinmiyor	-	Bilinmiyor	-
TLR11	Uropatojenik bakteri faktörleri, profilin	-	MyD88	-
TLR12	Bilinmiyor	-	Bilinmiyor	-
TLR13	Bilinmiyor	-	Bilinmiyor	-

2.4.2. TLR'nin Sinyalizasyonu

TLR sinyal yolağı üzerine yapılan çalışmalar sürekli olarak artmakta ve yeni bulgularla bu yolda görev alan genler, mikro RNA'lar (miRNA), uzun kodlamayan RNA'lar gibi özgün ve yeni moleküller yolağına katılmaktadır. Bu araştırmalar devam ederken kabul görmüş olan MyD88 (myeloid farklılaşma faktörü 88) bağımlı ve MyD88 bağımsız (TRIF bağımlı) yolağın olmak üzere iki ana sinyal yolağına ayrılmaktadır (Akira ve Takeda 2004). Adaptör proteinlerden MyD88, MAL (MyD88 adapter-like), TRIF (TIR Bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini), TRAM (TRIF ilişkili adaptör molekül), ve TIRAP (TIR ilişkili protein) TLR sinyal yolağında rol alan önemli molekülleri oluşturmaktadır. Sinyal yolağındaki diğere anahtar proteinler ise, IL-1 reseptör ilişkili kinazlardan IRAK1, IRAK2 ve IRAK4 proteinleri, TAK1 (TGF activated protein kinaz) TRAF (TNF reseptör ilişkili faktör) yer almaktadır (İnci ve Pişkin 2007, Güven ve Can 2012, Akira ve Takade 2004).

TLR sinyal yolağının aktivasyonu ligandın bağlanmasını takiben TLR'lerin dimerizasyonu ile başlamakta olup sonrasında, TIR domain kısımlarına TIR domainine bağlanma bölgesi içeren adaptör proteinlerin (MyD88, TRIF, TRAM, MAL gibi) bağlanması gerçekleşir. Böylece downstream de görev alan proteinlerin aktivasyonu için ara basamak gerçekleşmiş olur. TLR3 dışındaki tüm TLR'ler MyD88 proteinine ihtiyaç duymakta olup, TLR4 ise sinyal iletimini aktarmak için hücre zarından endozomlara geçer. Adaptör proteinlerin bağlanmasını takiben, IRAK ve TRAF etkileşimleri gerçekleşir ve bu durum MAPK (mitogen activated protein kinaz), JNK (JUN N-terminal kinaz) ve p38 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu tetiklenmektedir. TLR sinyal iletiminin downstream hedefleri arasındaki yer alan temel transkripsiyon faktörleri NFkB (Nüklear Faktor kappa B) ve IRF (İnterferon regulatory factor), CREB (cyclic- AMP responsive element binding protein) ve AP1 (Aktivatör Protein 1) gibi transkripsiyon faktörleridir. TLR aktivasyonuna bağılı olarak hücrenin verdiği temel cevap pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin üretilmesidir (Akira ve Takeda 2004, Kawasaki ve Kawai 2014, L. A. J. O'Neill ve Bowie 2007, Yamamoto vd 2003). TLR sinyal iletim yolağı ve downstreamindeki hedef proteinler ile proteinler arası etkileşimler Şekil 2.8'de gösterilmiştir (Web_2).



Şekil 2.8 TLR Sinyal İletim Yolağı diyagramı (Web_2)

2.4.2.1. MyD88-Bağımlı Yolak

TLR sinyal yolağında TIR domainleri ile MyD88 ve MAL proteinleri ile etkileşmesinden sonra “Myddosome” olarak anılan IRAK kinaz ile bir kompleks oluştururlar. Myddosome formasyonun oluşumu sırasında IRAK4, IRAK1 i aktiveleştirip otofosforilasyonunu tetikler. Sonrasında IRAK1 MyD88’den ayrılır. Fosforillenen IRAK 1 TRAF 6’yı reseptör kompleksine çeker (Kawasaki ve Kawai 2014, Lin vd 2010). TRAF 6 ubikutin ligaz özelliğine sahiptir ve kendi ubikutinleşmesini tetikler ve ubikutinlenmiş TRAF6, TAK1 ve ilişkili proteinler olan TAB1, TAB2, TAB3’ü aktiveleştirir. Bu aktiveleşme sonucunda IKK (Inhibitor of nuclear faktör kappa B) kompleksleri ve MAPKK’lar uyarılır (Ajibade vd 2013, Z. J. Chen 2012, Kawasaki ve Kawai 2014). Böylece ERK, JNK, p38 gibi MAP kinazlar ile NFκB ve AP1 gibi transkripsiyon faktörleri aktiveleşir. Bu durum sonucunda TNF alfa, IL-1, IL-6, IL-12 gibi inflamatuvar ilişkili faktörlerin transkripsiyonu aktive edilmiş olur (Guyen Maiorov vd 2013, Kawasaki ve Kawai 2014).

2.4.2.2. MYD88-Bağımsız (TRIF-Bağımlı) Yolak

TRIF-bağımlı yolak, TLR3 ve TLR4 tarafından kullanılmaktadır TLR4, hem MyD88-bağımlı hem de MyD88-bağımsız yolağı kullanabilmektedir. TRIF-Bağımlı yolda, TLR3, TRIF üzerinden TRAF ve IRF3 ve IRF7’nin uyarılmasını sağlayarak, TLR4 ise TRAM üzerinden TRIF’i uyararak Tip 1 IFN inflamatuvar sitokin yanıtını tetikler. Ayrıca TLR4, IRAK4 ve TRAF aktive edilmesi üzerinden NFκB transkripsiyon faktörünü

aktive uyararak proinflamatuvar sitokin yanıtı tetikleyebilir (Kawasaki ve Kawai 2014, L. A. J. O'Neill ve Bowie 2007).

2.4.3. Dermatolojik Hastalıklarda Toll Benzeri Reseptörler

TLR'lerin oldukça geniş hastalık grubu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Bunlar arasında kanser, kardiyovasküler hastalıklar, otoimmün hastalıklar, diyabet, dermatolojik hastalıklar gibi oldukça geniş yelpazedeki hastalıklar bu gruba girmektedir (Güven ve Can, 2012). TLR'ler deride keratinositlerden, fibroblastlara, makrofajlardan T ve B hücrelerine kadar oldukça çok sayıdaki hücre çeşidinde eksprese edilebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TLR'ler ile kutanöz konakçı savunmasında bakteri, virüs ve mantar kaynaklı patojenlere karşı geliştirilen biyolojik mekanizmalarda görev aldığı gösterilmiştir. TLR'lerin pek çok dermatolojik hastalığın patofizyolojisinde rol oynayabildiği ve birçoğu ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Karaca ve Öztürk (2012) tarafından ortaya koyulan araştırmada bu dermatolojik hastalıklardan bazıları arasında, psöriyazis, kutanöz sifilik lezyonlar, atopik dermatit, behçet hastalığı gibi hastalıkları sıralamışlardır (Karaca ve Öztürk 2012). Mikozis fungoides ile yapılan çalışma sayısı oldukça kısıtlı olup MF'te TLR2, TLR4 ve TLR9 ekspresyonlarında artış olduğunu ve bu artışların derideki T lenfosit hücrelerinin kronik aktivasyonu ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Jarrousse vd 2006). Ayrıca yapılan bir diğer araştırmada TLR7 ekspresyonunun MF'te azaldığı ve bu azalışın kullanışlı bir prognostik faktör olabileceği değerlendirilmiştir (El Tawdy vd 2017).

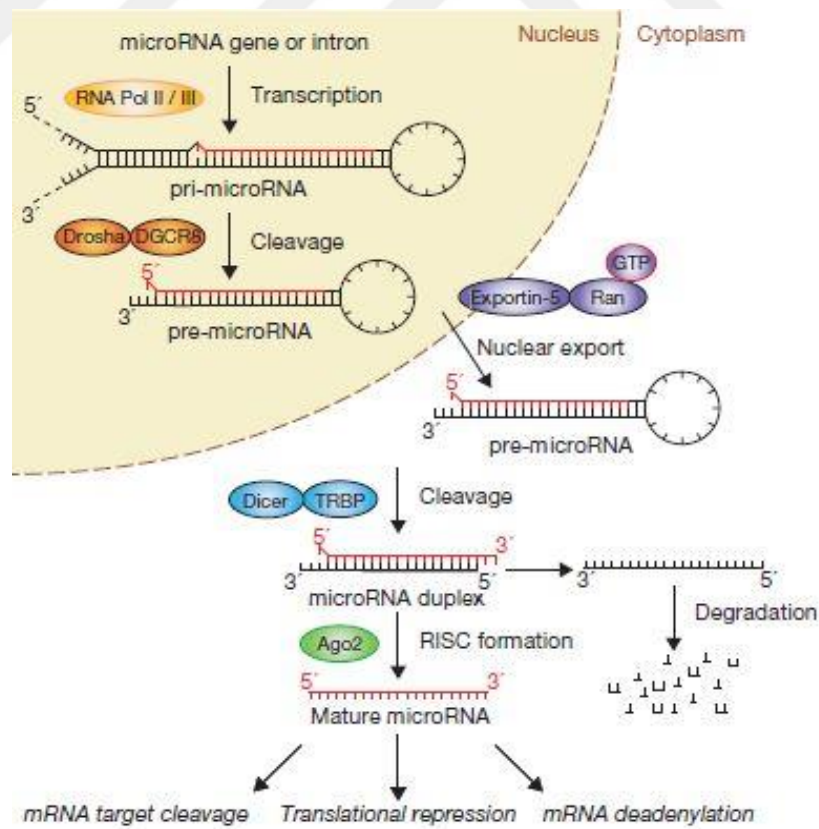
2.5. Mikro RNA'lar (miRNA'lar)

Mikro RNA'lar ~19–24 nükleotit (nt) uzunluğunda, hedef mRNA'lardaki tamamlayıcı bölgelerle baz eşleştirmesi yoluyla işlev gören dolayısıyla translasyonun baskılanmasına veya doğrudan mRNA degradasyonuna sebep olan küçük kodlamayan RNA'lardır (Bayraktar vd 2019, Chen vd 2013). Gelişim, farklılaşma, homeostazi, apoptoz, immün aktivasyon, sinyal iletim yolları ve karsinogenez gibi pek çok biyolojik olayın gerçekleşmesinde rol aldıkları ortaya konulmuştur (Bartel 2004).

2.5.1. miRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezinin temel basamakları sırasıyla, miRNA genlerinden pri-miRNA'ların transkripsiyonunun gerçekleşmesi, sonrasında pri-miRNA'ların nükleus içinde pre-miRNA'lara dönüştürülmesi ve en sonunda pre-miRNA'ların sitoplazmaya taşınıp burada olgun miRNA'lara dönüştürülmesini kapsar (O'Brien vd 2018, Winter vd 2009).

Pri-miRNA'lar, nükleusta RNA polimeraz II tarafından (bir kısmı RNA polimeraz III tarafından) transkribe edilmekte olup ayrıca hairpin (saç tokası) yapısı, terminal uç bölgeleri ile cap'lenmiş ve poli-adenil'lenmiş olarak bulunur. Bu hairpin yapısı Drosha olarak adlandırılan bir RNAaz III enzimi ve enzimin kofaktörü görevini yapan DGCR'den oluşan kompleks tarafından 60-70 nt uzunluğunda pre-miRNA'lara dönüştürülür. Pre-miRNA'ların nükelustan sitoplazmaya taşınması işlemi RAN-GTP bağımlı olarak Exportin 5 (XPO5) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Pre-miRNA'lar sitoplazmada diğer bir RNAaz III enzimi olan Dicer ile 21-24 nt uzunluğunda çift-zincirli olgun miRNA'yı oluşturmak üzere modifiye edilirler. miRNA'nın kendine özgü uçları ve uzunlukları indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) tarafından tanınmada önemli olup, miRNA zincirleri, RISC'i tamamlayıcısı oldukları mRNA molekülüne yönlendirir. RISC'in temel bileşeni olan Argonaute mRNA kesimi için temel katalitik bölge işlevini görmektedir. Böylece miRNA'nın RISC kompleksine yüklenmesi ile mRNA destabilizasyonu veya translyasyonel olarak baskılanması gerçekleşir. Şekil 2.9'da miRNA biyogenezinin basamakları gösterilmiştir. (Bartel 2004, Winter vd 2009, Gündoğdu ve Çelik 2009, Saydam vd 2011, Hitit vd 2015).



Şekil 2.9 miRNA biyogenezini (Winter vd 2009)

2.5.2. miRNA ve Toll Benzeri Reseptörler İlişkisi

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, miRNA'ların immun sistem fonksiyonlarının regülasyonunda Toll benzeri reseptörlerde dahil olmak üzere inflamasyon ilişkili genleri hedefleyerek immun hücre fonksiyonlarının çeşitli yönleriyle düzenlenmesinde rol alırlar. miRNA'lar bu dolaylı düzenleyici rolünün yanı sıra, belirli TLR'lerin fizyolojik ligandları olarak da hareket edebilir ve immün yanıtın sinyal kaskadını başlatabilirler (Bayraktar vd 2019). Yapılan çalışmalar sonucunda hücrede histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlanmayan RNA'lar gibi spesifik epigenetik mekanizmalar işletilerek TLR'lerin transkripsiyonel cevaplarının düzenlenebileceğini göstermiştir (Bayraktar vd 2019, Liew vd 2005).

TLR ve miRNA ilişkisi üzerine yapılan çalışmalarda, miR-21, miR-146, miR-155 ve let-7 ailesi gibi çeşitli miRNA gruplarının TLR'leri, TLR sinyal yolağında görev alan diğer genleri ve ya sitokin mRNA'larını hedefleyerek inflamasyon, T hücre aktivasyonu, hücreyel infiltrasyon ve immün gelişimi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol aldığı rapor edilmiştir (Bayraktar vd 2019, O'Connell vd 2010, L. A. O'Neill vd 2011).

2.5.3. Kutanöz T Hücreli Lenfomada miRNA'ların Rolü

KTHL patogenezi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, antijen stimülasyonu, SRC (proto-onkogen, non-reseptör tirozin kinaz) gen ekspresyonundaki farklılıklar, sitokin sinyal iletimindeki ve apoptotik yollardaki disregülasyon ile epigenetik değişiklerin rol oynadığı düşünülmektedir. Yakın zamanda yapılan araştırmalar kapsamında, patogenezi de rol oynayan bu faktörlerin yanında aynı zamanda miRNA ekspresyon değişimlerinin de rol oynuyor olabileceği önerilmektedir (Girardi vd 2004, Ralfkiaer vd 2014).

Valencak ve arkadaşları tarafından yüksek DICER ekspresyonun KTHL için negatif prognostik faktör olduğunu rapor etmişlerdir (Valencak vd 2011). Ayrıca KTHL'de miR-155, miR-21 ve miR-199/214 ekspresyonlarının upregüle, miR-223 ve miR-150'nin down-regüle olduğu ve bazı miRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı rol oynayarak KTHL karsinogenezi de proliferasyon, apoptoz ve invazyon gibi hücreyel olaylarda rol oynayabileceği belirtilmiştir (Ralfkiaer vd 2014, van Kester vd 2011). Literatürde kısıtlı sayıda miRNA'lar ve KTHL'deki ekspresyon değişimi ile ilgili çalışma bulunmakla birlikte mikozis fungoides özelinde, özellikle erken MF ve geç MF gibi evreler arası miRNA değişimlerinin belirlenmesi, kapsamlı olarak hem hasta hem hücre hattı içeren miRNA

profilleme çalışmalarının yapılması hastalığın patogenezinde önemli katkı sağlayabilir (Ralfkiaer vd 2014).

2.6. Hipotez

Doktora tez çalışmamızın literatür taraması kapsamında belirtilen bilgiler ışığında hipotezleri,

- 1- Toll Benzeri reseptörlerin, bu yolakta görev alan genlerin ve downstreamdeki hedef genlerin ekspresyonlarının hem mikozis fungoides hasta grubunda hem hücre hattında kontrole göre farklılık göstereceği ve patogeneze aydınlatılması açısından bilgiler sunacaktır.
- 2- Toll benzeri reseptörler ile ilişkili miRNA'ların ekspresyon değişimlerinin mikozis fungoides hasta grubunda ve hücre hattında kontrole göre farklılıklar göstereceği ve patogeneze aydınlatılması açısından bilgiler sunacaktır.
- 3- T hücre klonalitesinin mikozis fungoides tanılı hastalarda klinik durum tespiti, hastalık seyri ve tanı koymada yardımcı bir yöntem olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

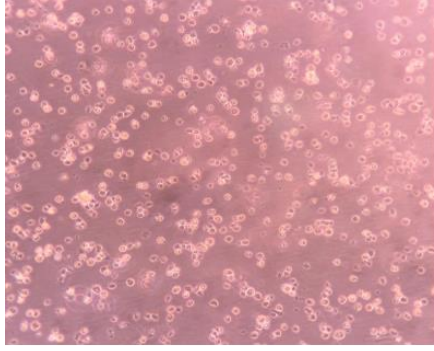
3.1. Çalışma Materyalinin Seçimi, Toplanması ve Mikrotom ile Kesit Alma

Çalışmanın etik kurul izni Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul'u tarafından 01.08.2017 tarih ve 10 sayılı kurul kararı ile alınmıştır. İlgili etik kurul izin belgesi EK-9'da sunulmuştur.

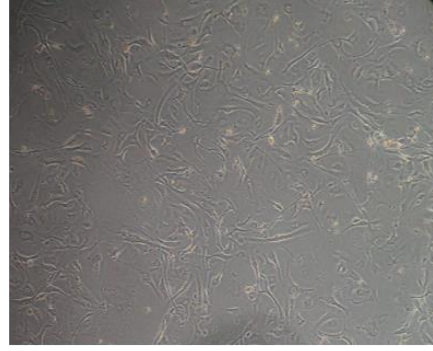
Pamukkale Üniversitesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim dalı ve Patoloji Anabilim dalı tarafından ortaklaşa tanısı koyulan ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda, parafin bloklara gömülü (FFPE) şekilde arşiv materyali olarak tutulan, "Mikozis fungoides" tanısı almış 52 vaka çalışmaya alındı. Kontrol grupları ise arşivdeki parafin bloklardan tümör komşuluğundaki normal deri örnekleri alındı ve 50 adet kontrol çalışmaya dâhil edildi. Çalışmaya dâhil edilen vaka sayıları güç analizi yapılarak belirlendi. Güç analizi kapsamında orta derece etki büyüklüğü ($d=0,5$) kabul edilerek yapılan analizde tez çalışmamızda en az 102 (her çalışma grubu için 51) kişi alındığında %95 güvenle, %80 güç elde edileceği hesaplandı. Vaka seçiminde erken başlangıç evresinde yakalanmış ve tanısı kesinleşmemiş vakalar çalışmaya dâhil edilmedi. Vakaların seçiminde klinikopatolojik olarak vakalar arasından kesin tanı almış olanlar çalışmaya dâhil edildi. Çalışmada, olgulara ait %10 formaldehit solüsyonu ile tespit edilmiş, parafin bloklara gömülü (FFPE) doku örnekleri kullanıldı. Tüm olgulara ait H-E boyalı kesitler tanısız ve prognostik parametreler açısından tekrar değerlendirildi. Tüm olgulardan tümör dokusunu en iyi yansıtan, içinde nekroz, kanama, inflamatuvar hücre ve stromal elemanların en az olduğu alanları içeren kesitler belirlenerek, bu kesitlere ait parafin bloklardan RNA ve genomik DNA izolasyonu için 15 mikron kalınlığında mikrotom cihazı (Leica RM2125RT, Almanya) ile ardışık seri kesitler alınarak ependorf tüplerine koyuldu.

3.2. Hücre Kültürü

Tez çalışmamızın hücre kültürü kısmında, pozitif kontrol grubu olarak mikozis fungoides hücre hattı olan "MJ [G11] (ATCC® CRL-8294™) ATCC® Number: CRL-8294)" ticari olarak temin edildi (Şekil 3.1). BJ (ATCC® CRL-2522™) deri fibroblast hücre hattı da MJ ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla kendi stoklarımızdan kullanıldı. MJ hücresi süspanse olarak çoğalan, mikozis fungoides çalışmalarında hücre kültürü modeli olarak kullanılan ve CD2 +; CD3 +; CD4 + karaktere sahip T lenfosit hücre hattıdır. MJ ve BJ hücrelerinin özellikleri ve karakter bilgileri Tablo 3.1'de verilmiştir.



MJ HÜCRE HATTI (10x)



BJ HÜCRE HATTI (10x)

Şekil 3.1 Çalışmamızda kullanılan hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri (10X büyütme)

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan hücre hatlarının karakteristik özellikleri (Web_3, Web_4)

Özellikler	MJ [G11] (ATCC® CRL-8294™)	BJ (ATCC® CRL-2522™)
Organizma	İnsan (<i>Homo sapiens</i>)	İnsan (<i>Homo sapiens</i>)
Doku	Perifrik kan	Deri
Hücre Tipi	T lenfosit	Fibroblast
Morfoloji	Lenfosit	Fibroblast
Kültür Özelliği	Süspanse	Aderent
Hastalık	Kutanöz T Hücreli Lenfoma: Mikozis Fungoides	Normal
Yaş-cinsiyet-Etnik köken	50 yaş – Erkek – Kafkas	Yeni doğan, Erkek

Hücre Kültürünün temel basamaklarını hücrelerin çözülmesi, hücrelerin kültür kaplarında (petri, flask) çoğaltılması, pasaj işlemlerinin yapılması, deneylere hazır hale getirilmesi, sayım işlemlerinin yapılması, dondurularak saklanması gibi işlemleri içermektedir. Çalışmamamızda kullanılan hücrelerin yaşam faaliyetlerini devam ettirmeleri ve deneylerin takibi için kullanılan besi ortamı%1 Sodyum Piruvat ve L-glutamin içeren (2mM), %10 Fetal bovin serum (FBS) ve %1 non-esansiyel amino asit ve 100IU/ml penisilin ile desteklenmiş DMEM besi yeridir. Hücrelerin takibi, konfluentlik durumları ve karakterleri inverted mikroskop (Nikon, Japonya) ile izlenmiş ve kültürasyonları 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatörde uygun koşullarda yapılmıştır. Pasajlama işlemi, hücrelerin yoğunlukları %85 civarına ulaştığında, MJ hücresi süspanse olduğu için direk, BJ hücresi ise tripsinizasyonla (%0,05 Tripsin-EDTA)

yapıştığı flastktan kaldırılarak 1500 rpm de 4 dakika 15 ml kapasiteli falkon tüpler içinde santrifügasyon işlemi sonucu çöken hücrelerin yeniden ekimi ile gerçekleştirildi. Hücrelerin hem hücre atıklarından hem de ölü hücrelerden ayrılması için yıkama amaçlı Fosfat Buffer Tampon (PBS) kullanıldı.

Hücrelerin sayılmasında Tripan mavisi dışlama yöntemi temel alınarak Neubauer lamı (Marienfeld-Superior, Almanya) kullanıldı. Tripan mavisinin hücre sayımında temel kullanım prensibi, boya alan ölü hücrelerin ve canlı hücrenin membranından geçemediği için boya almayan canlı hücrelerin inverted mikroskop ile gözlemlendiğinde ayırt edilmesine, temel hücre şekil ve membran yapısının incelenmesine olanak sağlanmasına dayanmaktadır. Neubauer lamı ile sayım için 50 µl Tripan mavisi ve 50 µl sayımı yapılacak hücre süspansiyonundan 1:1 oranında oluşturulan karışımdan 10 µl alınıp lamın üzerine ekilip lamelle kapatıldı. 10X büyütmede 4 büyük alanın sayıldı ve takiben aşağıda belirtilen formül ile mililitredeki hücre sayım işlemi tamamlandı. Hücre sayımı ile deneyler için standardizasyonun sağlanması ve eşit sayıda hücre ekimi yapılması sağlanmaktadır.

$$\text{“Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)”} = \frac{\text{“Hücre sayısı”} \times 10.000}{\text{“Alan sayısı”} \times \text{“Seyreltme faktörü”}}$$

Hücreler, sonraki deney basamakları ve ileriye yönelik kullanım için pasajlama basamağından sonra santrifügasyonla tripsinin uzaklaştırılmasını takiben, dimetil sülfoksit (DMSO) ile %10 DMSO oranı olacak şekilde (9:1 oranında besi yerindeki hücreler ve DMSO ile) homojenize edilip kriyotüpler içinde -80 °C de dondurularak saklandı. Dondurulan hücrelerin tekrar çözülüp deney için ekilmesi işlemi de -80 °C de önceden dondurulan kriyotüpteki hücrelerin hızlı bir şekilde 37°C ye ayarlanmış olan su banyosunda çözdürülüp 1500 rpm’de 4 dakika santrifügasyonundan sonra, DMSO içeren eski besi ortamı süpernatat ile dökülüp uzaklaştırıldı. Üzerine taze besi yeri eklenerek kültür kaplarına ekim işlemi yapılarak uygun kültür koşullarında çoğaltıldı.

3.3. RNA İzolasyonu

3.3.1. Parafine Gömülü Dokudan Kit ile RNA İzolasyonu

Mikozis fungoides tanısı almış olan hasta seçilen hasta grubuna ve kontrol grubuna ait olan parafine gömülü bloklardan (FFPE:Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded; formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku) mikrotom (Leica, Almanya) ile her biri 15 mikron kalınlığında olacak şekilde ayrı ayrı ependorf tüplerine RNA, miRNA ve DNA izolasyonları için örnek alındı. 52 hastaya ve 50 kontrole ait örneklerden total RNA ve

miRNA izolasyon işlemleri Qiagen RNeasy FFPE kitleri (Cat. No: 73504, Lot:157055004) ve Qiagen miRNeasy FFPE kit (Cat No: 217504) izolasyon kitleri ile yapıldı. Total RNA ve miRNA izolasyon kitleri protokolü ve kullanılan kimyasallar benzer olup kullanılan kolonları farklılık arz etmektedir. Total RNA izolasyonun temel basamakları öncelikle fazla parafinin uzaklaştırılıp deparafizasyonun gerçekleştirilmesi ve takiben de üretici firmanın kit prosedürü kapsamın kolonlar yardımıyla RNA izolasyonun gerçekleştirilmesidir. Genel izolasyon protokolümüz aşağıda maddelendirildiği gibidir.

- Öncelikli olarak steril bisturi ve pens yardımıyla alınan mikrotom kesitlerinden parafinler uzaklaştırıldı ve takiben 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin üzerine deparafinizasyon amacıyla 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi. Kuvvetli vorteksleme işlemi yapılarak homojenizasyon ve ksilenin tüm dokuya ksilenin nüfus etmesi sağlandı.
- Ksilen ilave edilen örnekler 56°C'ye ayarlı etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant dökülerek peletin dağılmamasına dikkat edilerek uzaklaştırıldı.
- Ksileni tamamen uzaklaştırmak için 1200 µl %100 etanol (Merck) ilave edilerek kuvvetli vorteksleme ile alkolün dokuya nüfus etmesi sağlandı ve takiben 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı.
- Süpernatantın uzaklaştırılmasını takiben, örnekler kapağı açık şekilde 37°C'ye ayarlı etüvde 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Böylece kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
- Parafini uzaklaştırılan örnekler kit içerisinde temin edilen 150 µl Buffer PKD eklenerek vortekslenmiştir. 10000 rpm'de 1dk santrifüj işlemi yapıldı.
- 10 µl proteinaz K eklenerek pipetleme yapılmıştır. Sonrasında proteinaz K'nın aktivite göstermesi için 56 °C 15 dk ve takiben proteinaz K'nın inaktivasyonu için de 80 °C 15 dk inkübasyon işlemi uygulandı.
- Elde edilen şeffaf faz 2 ml'lik yeni mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. Buz üzerinde 3 dk inkübasyondan sonra 13 500 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
- Süpernatant yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 16 µl DNA Booster Buffer ve üzerine 10 µl DNase I stok solüsyonundan eklenerek örnekler oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 320 µl kit ile temin edilen Buffer RBC ve 720 µl %100 etanol eklendi. 700 µl'lik örnek RNeasy MinElute spin çözüme aktarıldı. 10000 rpm'den büyük devirde 15 saniye santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildi.

- 500 µl kit ile temin edilen buffer PBE RNeasy MinElute spin kolona aktarıldı. 10000 rpm'den büyük devirde 2 dakika santrifüj işlemi uygulandı.
- RNeasy MinElute spin kolon yeni 2ml lik mikrosantrifüj tüpüne alınarak 5dk yüksek devirde santrifügasyon yapıldı. Sonrasında yeni tüpe aktarılan RNeasy MinElute spin kolonlarda 25 µl RNase-free water eklenerek 1 dakika yüksek devirde santrifüj işlemi uyguladı.
- Örneklerden RNA konsantrasyonunun ve saflık durumlarının tespiti, izole edilen RNA'nın 1 µl hacminde NanoDrop (Thermo) cihazı'nın kaidesine yüklenerek spektrofotometrik olarak yapıldı. Konsantrasyon ve saflık ölçümü sonrasında RNA örnekleri bir sonraki çalışma zamanına (cDNA sentezi ve RT-PCR deneyleri) kadar -20°C'de saklandı.

3.3.2. Trizol ile Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

- Hücreler 3×10^6 hücre olacak şekilde sayılarak MJ hücresi için santrifüjle çöktürülen hücrelerin üzerine 500 µl Trizol direkt olarak ve BJ hücrelerinin ise 6 well plakalara aynı sayıda ekilerek yapıştıktan sonra 500 µl Trizol eklenip cell scraper ile kazınarak mikrosantrifüj tüplerine eklendi.
- Her bir mikrosantrifüj tüpüne 100 µl kloroform ilave edilip iyice pipetleme işleminden sonra kloroformun iyice etki göstermesi için şiddetli vorteksleme yapılarak oda sıcaklığında 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra, soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya) ile +4°C' de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemi yapıldı. Santrifüj sonunda tüpte oluşan RNA'nın içinde bulunduğu renksiz üst faz alınıp ayrı mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol (2-propanol) eklenerek soğutmalı santrifüj +4°C' de 15.000 rpm' de 15 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırılarak oluşan peletin üzerine, %70'lik etanol konulup temizleme amaçlı, +4°C'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Sprenatant atılıp pelet oda sıcaklığında biraz mikrosantrifüj tüpünün ağzı açık kalacak şekilde hava ile kurutulmuş ve peletin üzerine 40 µl nükleaz içermeyen (RNase-DNase free) moleküler biyolojik grade su ile çözülmüştür.
- Örneklerden RNA konsantrasyonunun ve saflık durumlarının tespiti, izole edilen RNA'nın 1 µl hacminde NanoDrop (Thermo ABD) cihazı'nın kaidesine yüklenerek spektrofotometrik olarak yapıldı. Konsantrasyon ve saflık ölçümü

sonrasında RNA örnekleri bir sonraki çalışma zamanına (cDNA sentezi ve RT-PCR deneyleri) kadar -20°C'de saklandı.

3.4. cDNA (Komplementer DNA) sentezi

RT-PCR ile mRNA düzeyindeki ekspresyon değişimlerini tespit etmek amacıyla öncelikle yapılan Total RNA izolasyonunu takiben hem mRNA için hem de mikro RNA için revers transkriptaz enzimi ile ticari kitler yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.4.1. mRNA Ekspresyon Değişimi İçin cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'lardan RT-PCR öncesi, cDNA sentezi Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABD, Cat.no: 4368814) ile üretici firmanın belirtmiş olduğu prosedür doğrultusunda 96 well plakalar (Applied Biosystems™ MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate) kullanılarak StepOne Plus Real-Time (Applied Biosystem, ABD) PCR cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA sentez karışım prosedürü total RNA son konsantrasyon 2 µg olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentez karışımı Tablo 3.2'de verilmiştir. Karışım hazırlandıktan sonra kit protokolü doğrultusunda, cDNA sentezi için 25°C' de 10 dakika, 37°C' de 120 dakika inkübe edilmiş ve süre sonunda, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, hem doku hem hücre hatlarında gruplar arasındaki mRNA ekspresyon değişimini tespit etmek amacıyla Real-Time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2 cDNA sentez kit karışımı (AB)

	Hacim
Total RNA	Değişken
10X Random Primers	2 µl
25X dNTP karışımı	0,8 µl
10X RT tamponu	2 µl
RNAaz içermeyen su	Değişken
MultiScribe™ Reverse Transcritase	1 µl
Son hacim	20 µl

3.4.2. Mikro RNA Ekspresyon Değişimi İçin miRNA cDNA Sentezi

Mikozis fungoides tanılı hasta grubu ve kontrol grubuna ait parafine gömülü dokulardan ve aynı zamanda BJ ve MJ hücre hatlarından RNA izolasyonları yapıldı ve takiben miRNA cDNA Synthesis Kit with Poly(A) Polimerase Tailing (Abm, Kanada) ile miRNA cDNA sentezi gerçekleştirildi. Kit protokolü Tablo 3.3'te belirtildiği gibidir. İlk olarak tabloda birinci kısımda belirtilen kit komponentleri ve RNA karışımını hazırlandı. Hazırlanan reaksiyon karışımı 37 °C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Takiben miRNA Oligo (dT) adapter (10 µM) kit komponentinden 2 µl eklendi. Karışım 65 °C de 5 dakika inkübe edildi ve takiben 1 dakika buz üstünde bekletildi. Tabloda ikinci kısımda belirtilen kit komponentleri eklenerek senteze devam edildi. Elde edilen total karışım 42 °C de 15 dakika, 70 °C de 10 dakika termal cycle (Techne, UK) da inkübe edildi ve takiben 4 °C'ye alındı. RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilip miRNA ekspresyonlarının analiz edileceği çalışılmaya kadar -20 °C de muhafaza edildi.

Tablo 3.3 Mikro RNA CDNA Sentez kiti karışımı (abm)

Kit içeriği	Hacim
Birinci Kısım	
Total RNA	Değişken
5X Poly(A) Polymerase Reaction Buffer	2 µl
ATP (10 mM)	1,5 µl
25 mM MnCl ₂	1 µl
Poly(A) Polymerase, Yeast (1U/ µl)	Değişken
RNase-içermeyen H ₂ O	Son hacim 10 µl ye tamamlanır.
37 °C de 30 dakika inkübasyon	
Oligo (dT) adapter (10 µM)	2 µl
65 °C de 5 dakika inkübasyon	
İkinci Kısım	
dNTPs	1 µl
5X RT Buffer	4 µl
EasyScript™ RTase (200 U/ µl)	1 µl
RNase-içermeyen H ₂ O	2 µl
Son Hacim	20 µl

3.5. Real- Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real-Time PCR, gen ve kodlanmayan RNA ekspresyon ürününün kantitasyonu tespit edebilmek için kullanılan yüksek hassasiyetli moleküler temelli bir tekniktir. Real-Time PCR yöntemi kullanılarak, RNA örneklerinin kalitatif ve kantitatif olarak kısa bir zaman diliminde analizine imkân tanınmakta ve böylelikle çok sayıda örnek tek bir plaka içinde düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmekte ve reaksiyon esnasında bilgisayar ekranından florasandaki değişim eş zamanlı takip edilebilmektedir. Real-Time PCR deneylerinde, reaksiyon sırasında analizine imkân tanınması ve reaksiyon sonunda jel elektroforezi ve UV görüntüleme gibi ek deney basamaklarına gerek kalmaması da bu tekniğin avantajları arasındadır.

3.5.1. Real-Time PCR ile mRNA Ekspresyon Analizi

Bu tez çalışması kapsamında mikozis fungoides hasta örneklerinde ve hücre hattında kontrole göre Toll benzeri reseptörlerin, ilişkili yolakta rol aldığı bilinen genlerin ve downstream hedeflerindeki genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonları ile bu yollarda rol aldığı bilinen mikro RNA'ların ekspresyon değişimleri Real-Time PCR ile araştırıldı. Çalışmamızda Toll benzeri reseptörlerle ilişki yollarda görev alan (MyD88 bağımlı ve bağımsız) ve downstreamdeki hedeflerden, *TLR1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, MyD88, TIRAP, IRAK4, TRAF6, IRF7, TRAF3, TRIF(TICAM-1), MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 (p38), Elk1, NFkB (REL-A), IRAK1 ve TAB2* olmak üzere 25 adet genin mRNA ekspresyon değişimi tespit edildi. *Beta aktin* normalizasyon amaçlı housekeeping olarak kullanıldı. Genlerin reverse ve forward dizileri Tablo 3.4'te verildi. Diziler OriGene (<https://www.origene.com/>) online web sayfası ve BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yazılımları kullanılarak dizayn edildi.

Tablo 3.4 Çalışmada kullanılan genlerin reverse ve forward dizileri

#	Name	Sequence
1	<i>TLR1_F</i>	CAGCGATGTGTTTCGGTTTTCCG
2	<i>TLR1_R</i>	GATGGGCAAAGCATGTGGACCA
3	<i>TLR2_F</i>	TTATCCAGCACACGAATACACAG
4	<i>TLR2_R</i>	AGGCATCTGGTAGAGTCATCAA
5	<i>TLR3_F</i>	GGCTAGCAGTCATCCAACAGAA
6	<i>TLR3_R</i>	GCAGTCAGCAACTTCATGGC
7	<i>TLR4_F</i>	CCCTGAGGCATTTAGGCAGCTA

8	<i>TLR4_R</i>	AGGTAGAGAGGTGGCTTAGGCT
9	<i>TLR5_F</i>	CCTTACAGCGAACCTCATCCAC
10	<i>TLR5_R</i>	TCCACTACAGGAGGAGAAGCGA
11	<i>TLR6_F</i>	TTCTCCGACGGAAATGAATTTGC
12	<i>TLR6_R</i>	CAGCGGTAGGTCTTTTGGAAAC
13	<i>TLR7_F</i>	CTTTGGACCTCAGCCACAACCA
14	<i>TLR7_R</i>	CGCAACTGGAAGGCATCTTGTAG
15	<i>TLR8_F</i>	ACTCCAGCAGTTTCCTCGTCTC
16	<i>TLR8_R</i>	AAAGCCAGAGGGTAGGTGGGAA
17	<i>TLR9_F</i>	TGAGCCACAACCTGCATCTCGCA
18	<i>TLR9_R</i>	CAGTCGTGGTAGCTCCGTGAAT
19	<i>TLR10_F</i>	GGTAAAAGACGTTTCATCTCCACG
20	<i>TLR10_R</i>	CCTAGCATCCTGAGATAACCAGG
21	<i>MyD88_F</i>	GAGGCTGAGAAGCCTTTACAGG
22	<i>MyD88_R</i>	GCAGATGAAGGCATCGAAACGC
23	<i>TIRAP_F</i>	AGCGATGCTTCACAGCCTACCT
24	<i>TIRAP_R</i>	GTCTTTGCTCCAGCGACTACTG
25	<i>IRAK4_F</i>	ATGCCACCTGACTCCTCAAGTC
26	<i>IRAK4_R</i>	CCACCAACAGAAATGGGTCGTTT
27	<i>IRAK1_F</i>	TCAGAACGGCTTCTACTGCCTG
28	<i>IRAK1_R</i>	TACCCAGAAGGATGTCCAGTCG
29	<i>TRAF6_F</i>	CAATGCCAGCGTCCCTTCCAAA
30	<i>TRAF6_R</i>	CCAAAGGACAGTTCTGGTCATGG
31	<i>IRF7_F</i>	CCACGCTATACCATCTACCTGG
32	<i>IRF7_R</i>	GCTGCTATCCAGGGAAGACACA
33	<i>TRAF3_F</i>	ACAAGTGCAGCGTCCAGACTCT
34	<i>TRAF3_R</i>	GCCTTGATCTGCTGGTTTGTCC
35	<i>TRIF(TICAM-1)_F</i>	ACCTTCTGCGAGGATTTCCAGG
36	<i>TRIF(TICAM-1)_R</i>	CGACAGTCGAAGTTGGAGGTGA
37	<i>B-AKTIN_F</i>	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC
38	<i>B-AKTIN_R</i>	CTGCTTGCTGATCCACATCTG

39	<i>IRAK1_F</i>	TCAGAACGGCTTCTACTGCCTG
40	<i>IRAK1_R</i>	TACCCAGAAGGATGTCCAGTCG
41	<i>TAB2_F</i>	TATTCAGCACCTCACGGACCCT
42	<i>TAB2_R</i>	CTTTGAAGTCGTTCCATTCTGGC
43	<i>MEK1_F</i>	GGTGTTC AAGGTCTCCCACAAG
44	<i>MEK2_R</i>	CCACGATGTACGGAGAGTTGCA
45	<i>MEK2_F</i>	GTGGTCACCAAAGTCCAGCACA
46	<i>MEK_R</i>	CACGATGTACGGCGAGTTGCAT
47	<i>ERK1_F</i>	TGGCAAGCACTACCTGGATCAG
48	<i>ERK1_R</i>	GCAGAGACTGTAGGTAGTTTCGG
49	<i>Elk1_F</i>	GCTGCCTCCTAGCATTCACTTC
50	<i>Elk1_R</i>	CCACGCTGATAGAAGGGATGTG
51	<i>ERK2_F</i>	ACACCAACCTCTCGTACATCGG
52	<i>ERK2_R</i>	TGGCAGTAGGTCTGGTGCTCAA
53	<i>JNK1 (MAPK8)_F</i>	GACGCCTTATGTAGTGA CT CGC
54	<i>JNK1 (MAPK8)_R</i>	TCCTGGAAAGAGGATTTTGTGGC

Reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5,5 µl syber green, 6,5 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl (1Reverse+1 forward) primer ve 1 µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu plakada kuruldu ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle (Applied Biosystems™ 96-Well Reaction Plate seal) kapatıldı. StepOne Plus gerçek-zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, 40 döngü olacak şekilde, 95°C'de 10 dk, 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 1 dk olarak amplifiye edildi.

3.5.2. Real-Time PCR ile Mikro RNA (miRNA) Ekspresyon Analizi

Bu tez çalışması kapsamında miRNA cDNA sentezini takiben, mikozis fungoides hasta örneklerinde ve hücre hattında kontrole göre Toll benzeri reseptörler ile ilişki yolakta rol aldığı bilinen mikro RNA'ların ekspresyonları Real-Time PCR ile tespit edildi. Çalışmamızda araştırılan 13 adet miRNA primerleri sırasıyla *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-200a-3p*, *hsa-miR-223-3p*, *hsa-miR-224-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-424-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-210-3p* ve *hsa-miR-204-5p* şeklindedir. U6 çalışmamızda normalizasyon amaçlı housekeeping miRNA olarak kullanıldı. Çalışmada kullanılan miRNA primerleri abm

firmasına ait olup cDNA sentez kiti ile çalışılabilecek uyumluluktur. Çalışılan miRNA'lara ait bilgiler Tablo 3.5'te yer almaktadır. Reaksiyon koşulları her bir kuyucukta 5,5 µl Evagreen Syber mix, 6,5 µl nükleaz içermeyen su, 2 µl primer ve 1 µl cDNA olacak şekilde 96-kuyucuklu plakada kuruldu ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle (Applied Biosystems™ 96-Well Reaction Plate seal) kapatıldı. StepOne Plus gerçek-zamanlı PZR cihazına yüklenen plaka, 40 döngü olacak şekilde, 95°C'de 10 dk, 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 1 dk olarak amplifiye edilmiştir.

Tablo 3.5 Çalışmamızda kullanılan miRNA bilgileri

Sıra	miRNA İsim	Katalog No	miRNA ID	miRNA Erişim No (Accession No)	miR-Base Bilgileri Linki (Sekans, fonksiyon, hedef vd.)
1	hsa-miR-146a-5p	MPH02204	MIMAT000449	MIMAT0000449	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000449
2	hsa-miR-200a-3p	MPH02296	MIMAT000682	MIMAT0000682	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000682
3	hsa-miR-223-3p	MPH02354	MIMAT000280	MIMAT0000280	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000280
4	hsa-miR-224-5p	MPH02358	MIMAT000281	MIMAT0000281	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000281
5	hsa-miR-375	MPH01555	MIMAT000728	MIMAT0000728	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000728
6	hsa-miR-155-5p	MPH02225	MIMAT000646	MIMAT0000646	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000646
7	hsa-miR-21-5p	MPH02337	MIMAT000076	MIMAT0000076	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000076
8	hsa-let-7e-5p	MPH02050	MIMAT000066	MIMAT0000066	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000066
9	hsa-miR-214-3p	MPH02333	MIMAT000271	MIMAT0000271	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000271

“Devamı arkada”

10	hsa-miR-424-5p	MPH026 24	MIMAT0 001341	MIMAT0001341	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0001341
11	hsa-miR-130a-3p	MPH021 70	MIMAT0 000425	MIMAT0000425	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000425
12	hsa-miR-210-3p	MPH023 20	MIMAT0 000267	MIMAT0000267	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000267
13	hsa-miR-204-5p	MPH023 09	MIMAT0 000265	MIMAT0000265	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT000265
14	U6-2	MPH000 01	NR_0027 52	NR_002752	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NR_002752

3.6. Web Tabanlı Programlar Yardımıyla miRNA Hedef Tayini ve Etkileşim Analizleri

miR-Tarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) (Web_5) ve Diana Tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) (Web_6) veri tabanları ve içerisinde yer alan mirPath v.3 tarama programı (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>) (Web_7) kullanılarak çalışmamızda kullanılan miRNA'ların hedefleri tespit edildi. Bu veri tabanları uygun mikro RNA dizileri ile seçilen hedef genlerin 3' UTR bölgeleri arasındaki eşleşmeyi baz alarak eşleşme lokalizasyon ve eşlesen dizi uzunluğu gibi parametreleri sunabilmektedir. Belirlenen miRNA'ların bu veri tabanları ve literatür bilgileri kullanılarak hedef tespiti, eşleşme, ekspresyon bilgisi gibi durumlar incelenebilmiştir. miR-Tarbase veri tabanı ile miRNA'ların fonksiyonel çalışmaları ile ilgili araştırma makalelerini sistematik olarak filtreleyip, toplanan western blot, mikro dizi, array ve yeni nesil sekanslama gibi deney verilerini de kapsayacak şekilde miRNA ve hedef tayini için tahmini ve valide sonuçları ortaya koyabilmesi ve bu alanda en güncel koleksiyonu sağladığından dolayı ve diğer veri tabanı olan Diana Tools veri tabanı kendi içinde içerdiği çeşitli veri tabanları ile miRNA çalışmaları için tahmini hedefleri ve deneylerle valide edilmiş hedefleri ortaya koyabilmesi ve aynı zamanda miRNA'ların görev aldığı ilgili yollar ve çeşitli algoritmaları analiz edebilmesi dolayısıyla tercih edilmiştir.

Gen fonksiyonlarının araştırılmasında detaylı sistematik analiz, genomik bilginin ve üst düzey fonksiyonel bilgi arasındaki ilişkilendirme durumu ve sinyal iletim yollarının kapsamlı analizinin yapılabilmesi gibi araştırmaların tespitine olanak sağlayan KEGG

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanı (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (Web_8) kullanılarak yolak analizi ve çalışılan miRNA'ların görev aldığı veya ilişkili olduğu sinyal iletim yolları tespit edildi. Ayrıca çalışılan mRNA'lar ile string analizi (<https://string-db.org/>) (Web_9) yapılarak Toll benzeri reseptörler arasındaki protein-protein ilişki ve etkileşim teyit edildi. Ayrıca, çalışılan miRNA'ların Toll benzeri reseptörler ve bu yolda görev alan genlerle olan ilişkisi ve etkileşimi string tabanlı olarak çalışan protein- RNA arasındaki ilişki, bağlantı ve etkileşim ve yolak analizini yaparak ortaya koyan veri tabanı olan Rain: RNA-protein (https://rth.dk/resources/rain/single_search.php?identifier=&organism=Human&submit=Search) (Web_10) ile analiz işlemi yapıldı.

3.7. DNA İzolasyonu

Çalışmaya dâhil edilen hasta grubundan alınan parafin blok kesitlerinden genomik DNA izolasyonu kit yardımı ile gerçekleştirildi. Mikozis fungoides tanısı almış olan hasta seçilen hasta grubuna ait olan parafine gömülü bloklardan (FFPE:Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded; formalinle fikse edilmiş parafine gömülü doku) mikrotom (Leica, Almanya) ile her biri 15 mikron kalınlığında olacak şekilde mikrosantrifüj tüplerine DNA izolasyonları için örnek alındı. 52 hastaya ait örneklerden genomik DNA izolasyon işlemleri Qiagen QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Cat No: 56404) ile yapıldı. DNA izolasyonun temel basamakları öncelikle fazla parafinin uzaklaştırılıp deparafizasyonun gerçekleştirilmesi ve takiben de üretici firmanın kit prosedürü kapsamın kolonlar yardımıyla DNA izolasyonun gerçekleştirilmesidir. Genel izolasyon protokolümüz aşağıda maddelendirildiği gibidir.

- Öncelikli olarak steril bisturi ve pens yardımıyla alınan mikrotom kesitlerinden parafinler uzaklaştırıldı ve takiben 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin üzerine deparafinizasyon amacıyla 1200 µl ksilen (Sigma-Aldrich) ilave edildi. Kuvvetli vorteksleme işlemi yapılarak homojenizasyon ve ksilenin tüm dokuya ksilenin nüfus etmesi sağlandı.
- Ksilen ilave edilen örnekler 56°C'ye ayarlı etüvde 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- Inkübasyon sonunda 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Süpernatant dökülerek peletin dağılmamasına dikkat edilerek uzaklaştırıldı.
- Ksileni tamamen uzaklaştırmak için 1200 µl %100 etanol (Merck) ilave edilerek kuvvetli vorteksleme ile alkolün dokuya nüfus etmesi sağlandı ve takiben 14 000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulandı.

- Süpernatanın uzaklaştırılmasını takiben, örnekler kapağı açık şekilde 37°C'ye ayarlı etüvde 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Böylece kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması sağlandı.
- Parafini uzaklaştırılan örnekler kit içerisinde temin edilen 150 µl Buffer PKD eklenerek vortekslendi ve takiben 10000 rpm de 1dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Örneklerle, kitle birlikte sağlanan 20 µL "Proteinaz K" ilave edildi ve örnekler vortekslendi. Ardından örneklerle kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.
- Tüplerin kapak kısımları parafilmle sarılarak, dokunun tamamen parçalanması için 56°C'ye ayarlı kuru blokta 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Hemen ardından 90°C 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun ardından tüpler, kısa bir santrifüj işlemine (short-spin) tabi tutuldu. Örneklerle, 200 µl "AL Tamponu" eklendi ve 15 saniye pulse-vorteks edilerek karıştırılıp, örneklerle, 200 µl "Etanol" ilave edildi ve 15 saniye kuvvetlice vorteks edildi. Ardından tüplere kısa bir santrifüj işlemi (short-spin) yapıldı.
- Kitle birlikte temin edilen 2 ml'lik toplama tüplerine "QIAamp Mini Spin Kolon"lar yerleştirildi ve bir önceki basamakta elde edilen karışım bu kolonlara mikropipet yardımı ile aktarıldı.
- Kolonların kapakları kapatılarak, 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra kolonlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve bir önceki toplama tüpleri atıldı.
- Kolonların kapakları açılarak, içerilerine kitle birlikte sağlanan 500 µl "AW1 Tamponu" eklendi. Kolonlar 8.000 rpm'de, 1dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra kolonlar temiz 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi ve bir önceki toplama tüpleri uzaklaştırıldı.
- Kolonlara kitle birlikte sağlanan 500 µl "AW2 Tamponu" eklendi ve 14.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi.
- Temiz toplama tüplerine yerleştirilen kolonlar, 14.000 rpm'de, 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra kolonlar, temiz 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Kolonlara kitle birlikte sağlanan 50 µl "ATE Tamponu" eklendi ve oda sıcaklığında (15-25°C), 5 dk inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon işleminden sonra kolonlar 8.000 rpm'de, 1 dk santrifüj edildi. Böylece örneklerinden genomik DNA izolasyonu işlemleri tamamlanmış oldu.
- Örneklerden DNA konsantrasyonlarının ve saflık durumlarının tespiti NanoDrop (Thermo, ABD) cihazı ile yapıldı. Konsantrasyon ve saflık ölçümü

sonrasında örnekler bir sonraki çalışma zamanına (Klonalite Deneylerine) kadar -20°C'de saklandı.

3.8. T Hücre Reseptörü Gama Klonalite Testleri

T hücre reseptörü Gama için yapılan klonalite çalışmasında Invivoscribe IdentiClone™ T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 (Cat. No: 9-207-1001, ABD) kiti kullanılarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD. laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Seçilen kaliteli DNA örnekleri T-hücre gama klonalitesini belirlemek için Biomed-2 primerleri kullanılarak multipleks PCR yöntemi kullanıldı. PCR'ın ardından tüm örnekler yalancı pozitifliği önlemek amacıyla heterodupleks analizi yapılacak poliakrilamid jel elektroforezi sistemine yüklendi. EtBr ile jeli boyama ve distile suda yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra jel görüntüleme sisteminde jel görüntülenerek ve fotoğrafı çekildi. Çekilen fotoğraftaki bantların büyüklüklerine ve analiz aralıklarına bakılarak her hasta için T hücre reseptörü gama klonalitesi değerlendirildi. Hastalardaki yaş, cinsiyet gibi klinikopatolojik veriler ile T hücre klonalitesi arasındaki ilişki değerlendirildi. Çalışma basamaklarının detaylı protokolleri aşağıda sırasıyla verilmektedir:

3.8.1. Klonalite Testine Uygun DNA Seçimi

Klonalite deneylerinde çalışılacak örneğin DNA kalitesinin ve konsantrasyonunun iyi derece olması deney sonucu açısından önem arz etmektedir. Özellikle parafin bloktan yapılan DNA izolasyonlarında düşük konsantrasyon ve kalitesiz DNA örnekleri klonalite çalışmasında sonuç verememektedir ve bu sebeple çalışılacak örneklerden sonuç verecek DNA'ların seçimi yapılması gerekmektedir. Ayrıca fragmanite olmuş DNA örneği ile yapılan testlerde sonuç alamama veya yanlış sonuç alma gibi durumlarla karşılaşılabilir. Bu sebeple de bazen özellikle parafin blok materyallerinden çalışılırken örnek kaybı yaşanabilir. Kaliteli bir değerlendirme yapabilmek için çalışılacak olan DNA'nın özellikle 300 bp'den küçük olmaması deneyi kolaylaştırmaktadır. Bu sebeple bu tez çalışmasında da genomik DNA izolasyonları yapılan örnekler; DNA izolasyonunun başarılı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla Invivoscribe IdentiClone™ T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0; (Cat. No: 9-207-1001, ABD) kitinde yer alan Speciman Control Size Ladder kullanılarak örneklerin DNA kalitesi kontrol edildi.

Genomik DNA izolasyonu başarılı olan örneklerin T Hücre klonalitesini tespit etmek amacıyla konansiyonel PCR (SENSQUEST labcyler, Almanya) yöntemi kullanıldı.

Speciman Control Size Ladder örneğinden 22,5 µl, 0,12 µl HotStar Taq DNA Polimeraz (Qiagen, Hollanda) ve 2,5 µl DNA olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR koşulları, 95°C 15 dk denatürasyon, 95°C 45 sn, 60°C 45 sn ve 72 °C 1.30 dk olacak şekilde 35 döngü amplifikasyon basamağı ve 72°C 10 dk son uzama basamağı şeklinde ayarlandı. DNA'ların 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:20 dilisyonları kullanılarak klonalite için uygun DNA'lar seçilmeye çalışıldı.

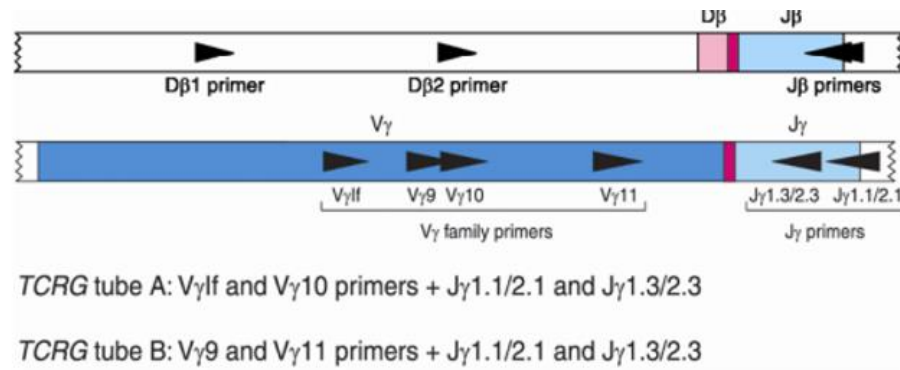
3.8.2. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR reaksiyonunu takiben agaroz jel elektroforezi ile PCR sonucu analiz edildi. Agaroz elektroforezi için öncelikle 50X TAE hazırlandı. Bunun için 242 g Tris (Sigma Aldrich) 500 ml distile suda çözüldü. 100 ml Na₂EDTA (Sigma Aldrich; pH:8,0) ve 57,1 ml glacial asetik (Sigma Aldrich) asit eklendi. Takiben dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan stok solüsyon 1X'e dilüe edilerek agarozun hazırlanmasında ve elektroforez tamponu olarak elektriksel akımın iletilmesinde kullanıldı. 0,8 gram agar (Sigma) 40 ml 1X TAE tamponunda mikrodalgada birkaç dakika çözüldükten sonra 5 µl SYBR Safe (İnvitrogen, ABD) boyası eklenerek tarakları yerleştirilmiş olan elektroforez sistemine kurumak üzere yerleştirildi. Yaklaşık yarım saatlik kuruma işleminden sonra tarak çıkarılıp elektriksel akım uygulanmak üzere sisteme yerleştirilen agarozu yüklemeye işlemleri gerçekleştirildi. 50 bp DNA marker (Thermo, ABD) 3 µl olacak şekilde örnekler de 8 µl PCR örneği ve 2 µl yüklemeye boyası olacak şekilde kuyucuklara yüklendi ve 90 voltta 45 dakika elektroforez cihazında (Thermo, ABD) yürütüldü. Elektroforez işleminin sonunda UV görüntüleme cihazı (DNR, İsrail) ile görüntülendi.

3.8.3. Multipleks PCR Reaksiyonları

T hücre Reseptörü klonal farklılığını belirleyebilmek için multipleks PCR yöntemi ile hazırlana tek bir reaksiyon ortamında çok fazla sayıda primer çiftinin kullanımı ile birçok hedef bölgesinin amplifikasyonu sağlanabilmektedir. Biomed-2 primerleri kullanılarak T hücre reseptörü beta için 3 reaksiyon ile "TCRB A: TCRBA: Vb-Jb1/2.2/2.6/2.7; TCRBB:Vb -Jb2.1/2.3/2.4/2.5; TCRBC: Db-Jb", T hücre reseptörü gama için 2 reaksiyon ile "TCRGA: Vcl/c10-Jc; TCRGB: Vc9/c11-Jc" (Şekil 3.2) ve T hücre reseptörü delta için "Vd-Jd" bölgelerini hedefleyen 97 primer ile gen klonalitesi tespit edilebilmektedir. Biz bu tez çalışmamız kapsamında mikozis fungoides tanısı almış hastaların T hücre reseptör gama klonal değişimini multipleks PCR tekniği ile belirledik. T hücre reseptörü gama A ve B olmak üzere iki master mix olmak üzere (TCRGA: Vcl/c10-Jc; TCRGB: Vc9/c11-Jc) multipleks PCR reaksiyonu hazırlandı. A reaksiyonları için kit ile temin edilen sırasıyla "Clonal Control 0009" pozitif kontrol ve B reaksiyonu "Clonal Control 0021"

kontaminasyon riskini kontrol edebilmek amacıyla negatif kontrol (poliklonal kontrol) olarak kullanıldı. Reaksiyon karışımları A tüpü için 22,5 µl TCRG A master mix, 0,12 µl HotStar Taq DNA Polimeraz ve 2,5 µl DNA örneği olacak şekilde, B tüpü için 22,5 µl TCRG B master mix, 0,12 µl HotStar Taq DNA Polimeraz ve 2,5 µl DNA örneği olacak şekilde hazırlandı. PCR koşulları, 95°C 15 dk denatürasyon, 95°C 45 sn, 60°C 45 sn ve 72 °C 1.30 dk olacak şekilde 35 döngü amplifikasyon basamağı ve 72°C 10 dk son uzama basamağı şeklinde ayarlandı. Reaksiyonlar SENSQUEST labcycler (Almanya) cihazı ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.2 Yeniden düzenlenmiş T hücre reseptörü gama geninin basitleştirilmiş diyagramı ve master mix içeriği (Web_11)

3.8.4. Heterodupleks Analizi

Multipleks PCR reaksiyonunu takiben herhangi bir yanlış bağlanma, yalancı pozitif sonuç elde edilmesi gibi durumların önüne geçmek için tüm örnekler için kolay ve ucuz olması sebebiyle çok tercih edilen bir teknik olan heterodupleks analiz işlemi gerçekleştirildi. Heterodupleks analizinin temel mantığı örneklerin öncelikle yüksek sıcaklığa maruz bırakılıp denatürasyonu ve sonrasında düşük sıcaklıkta soğutma (reannealing) işlemlerinin yapılmasına dayanmaktadır. Heterodupleks analizi için SENSQUEST labcycler (Almanya) cihazı ile gerçekleştirildi. Heterodupleks analizinde basamaklar 10-20 µl PCR ürününün denatürasyonu (5 dk 95 °C de) ve Reannealing (60 dk 4 °C de) aşamalarını içerecek şekilde yapılmıştır. İlk basamakta denatüre edilen DNA zincirlerinin tekrardan birbirlerine bağlanması sağlandı.

3.8.5. Dikey Jel Elektrofrez (PAGE) ve Görüntü Analizi

Heterodubleks analizi gerçekleştirilen örnekler klonal değişimin tespit edilebilmesi için polyacrilamid jele (%6) (acrilamid/bisacrilamid; 19:1) yüklendi. %6 olarak hazırlanan PAGE için oranlar dH₂O: 28,04 ml, 5X TAE: 9,6 ml, %30 Akrlamid/Bisacrilamid (Sigma): 9,6 ml, %10 APS (Amonyum per sülfat, Sigma), 600 µl ve Temed

(Tetramethylethylenediamine, Thermo Scientific™) 60 µl olacak şekilde ayarlandı. 2 saat süreyle donmaya bırakılan jellere örnekler, marker ve kontroller 5 µl olacak şekilde yüklendi. 0.5 x TBE ile 110 V olacak şekilde dikey jel elektroforezinde 2,5 saat süreyle yürütüldü. Yürütme işleminin ardından jeller cihazdan alınıp etidyum bromür boyası (Sigma) ile boyanıp 15 dakika boyanın jele tamamen işlemesi için oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Boyama işlemini takiben distile su ile yıkama basamağından sonra jel UV görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

UV görüntüleme cihazında elde edilen görüntülerde simir şeklindeki görüntüler poliklonal PCR ürünü olarak değerlendirildi. Analiz aralığında tespit edilen tek bant görüntüleri “klonal” PCR ürünü olarak, aynı analiz aralığında tespit edilen iki bant biallelik ve farklı analiz aralığında tespit edilen çoklu bantlar da “oligoklonal” olarak değerlendirildi. Ayrıca jele yüklenen pozitif ve negatif kontrolün de değerlendirmesinin yapıldı. Bu kapsamda pozitif kontrol örneğinin çalışmaması kurulan PCR reaksiyonunun problemlili olduğu, negatif kontrol örneğinin çalışması ise kurulan PCR reaksiyonunda bir kontaminasyon durumunun olabileceğini gösterdiği için jel değerlendirmesi yaparken analiz aralıklarındaki pozitif kontrol örneğinin çalıştığı ve negatif kontrolün de çalışmadığı kontrol edildi. Elde edilen klonalite sonuçları ile hastaların klinikopatolojik verileri arasındaki ilişki değerlendirildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS (IBM SPSS Statistic 21) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında İki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Spearman ya da Pearson korelasyon analizleriyle ve kategorik değişkenler arasındaki farklılıklar ise Ki kare analizi ile incelendi.

RT-PCR ile tespit edilen mRNA ve miRNA ekspresyon değişimi ile elde edilen verilerin analizinde $\Delta\Delta$ CT metodu kullanıldı. Web tabanlı “RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis” (<https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>) programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Volcano Plot testi ile hasta grubu ve kontrol grubu ile ilgili gen ve miRNA ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenebilmektedir. Ayrıca bu test ile iki veya çoklu gruplara ait ekspresyon değerleri $\pm 3SD$ karşılaştırılması temeline bağlı olarak analiz edildi ve gruplar arasındaki

istatistiksel değişim “Student t-testi” ile karşılaştırıldı. Kat değişimi değerleri (Fold change ve Fold regulation) de $\Delta\Delta\text{CT}$ tabanlı olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.2. Mikozis Fungoides Hasta Grubu ve Kontrol Grubuna ait Demografik Veriler

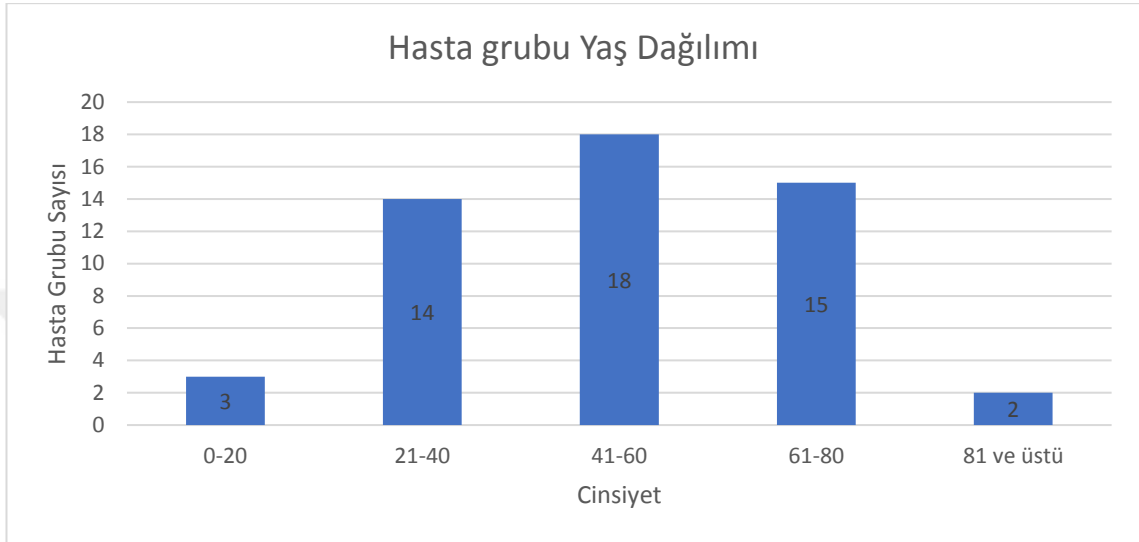
Pamukkale Üniversitesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim dalı ve Patoloji Anabilim dalı tarafından ortaklaşa tanısı koyulan ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı’nda, parafin bloklara gömülü (FFPE) şekilde arşiv materyali olarak tutulan, “Mikozis fungoides” tanısı almış 52 adet parafine gömülü blok örneği temin edildi. Kontrol grupları ise arşivdeki parafin bloklardan tümör komşuluğundaki normal deri örnekleri alındı ve 50 adet kontrol çalışmaya dâhil edildi. 52 adet vaka içeren hasta grubunun yaş ortalaması $50,78 \pm 2,59$ olarak tespit edilmiştir. Hasta grubu örneklerimizin 0-20 yaş aralığında 3 (%5,76), 21-40 aralığında 14, (Yüzde 25), 41-60 aralığında 18 (%34,65), 61-80 yaş aralığında 15 (%28,84) ve 81 ve üstü yaş aralığında 2 (%3,84) hastaya ait örneğimiz bulunmaktadır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Kontrol ve hasta grubuna ait örneklerin yaş dağılımı tablosu

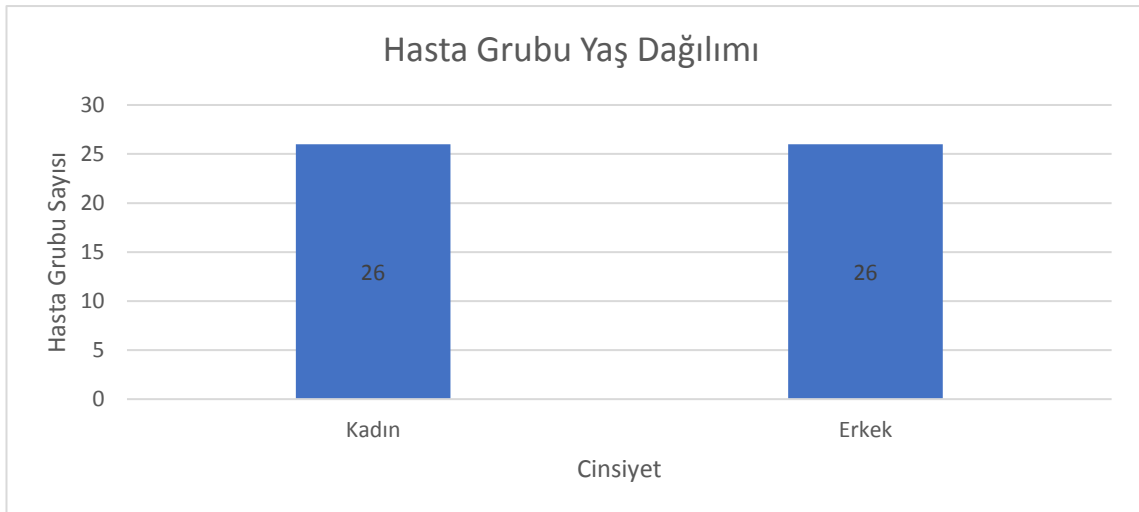
N	Yaş Hasta Grubu	Yaş Kontrol Grubu	Hasta Grubu		Kontrol Grubu		
			Yaş Aralığı	Frekans	Yüzde (%)	Frekans	Yüzde (%)
Std. Hata	2,59311	2,872394	0-20	3	5,8	2	4
Std. Sapma	18,6992	20,31088	21-40	14	26,9	8	16,1
Minimum	5	4	41-60	18	34,6	16	32
Maximum	102	87	61-80	15	28,8	20	40
Ortalama	50,78	56,72	81 ve üst	2	3,8	4	8
			Toplam	52	100	50	100
							Toplam

Hasta grubuna ait örneklerin 26 adeti (%50) erkek ve 26 adeti (%50) de kadındır. Kontrol grubu örneklerimizin toplam 50 örneğin 27 adeti erkek (%54) ve 23 adeti (%46) kadındır. Ortalama yaş $56,72 \pm 2,87$ olarak tespit edilmiştir. Yaş aralığı dağılımı ise 0-20

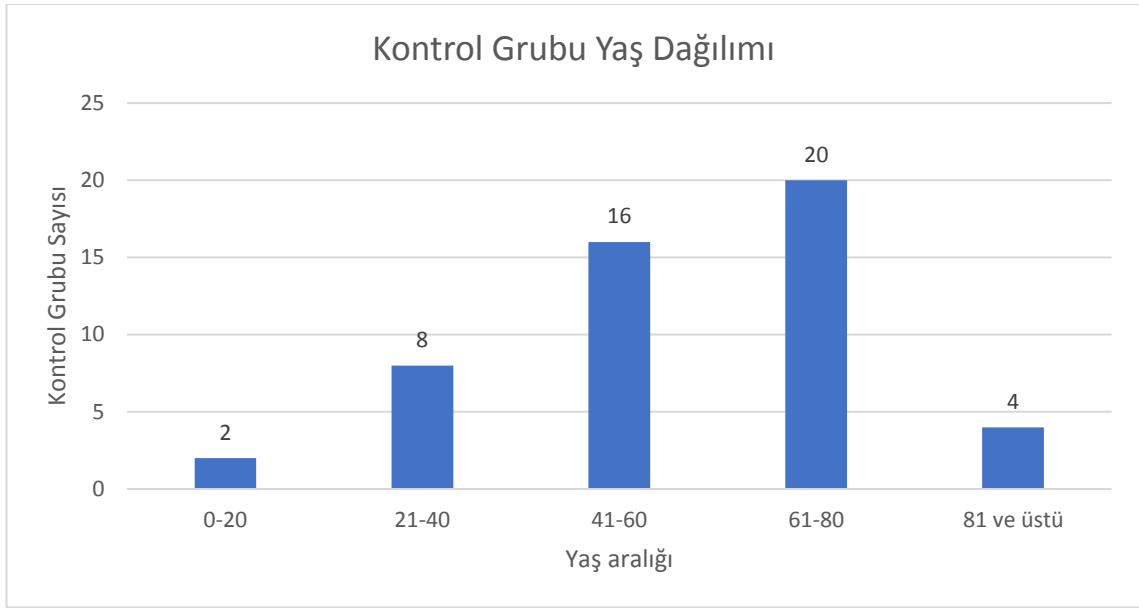
yaş aralığında 2 (%4), 21-40 aralığında 8, (%6), 41-60 aralığında 16 (%32), 61-80 yaş aralığında 20 (%40) ve 81 ve üstü yaş aralığında 4 (%8) olarak bulunmuştur (Tablo 4.1). Kontrol ve hasta gruplarımıza ait örneklerin yaş ve cinsiyet dağılımları Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4'te grafik halinde gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalık süreleri değerlendirildiğinde 1 ay ile 30 yıl arasında değişiklik göstermektedir. Ortalama olarak hastalık süresi 4,6 yıl ve standart sapması da 6,2 olarak hesaplanmıştır.



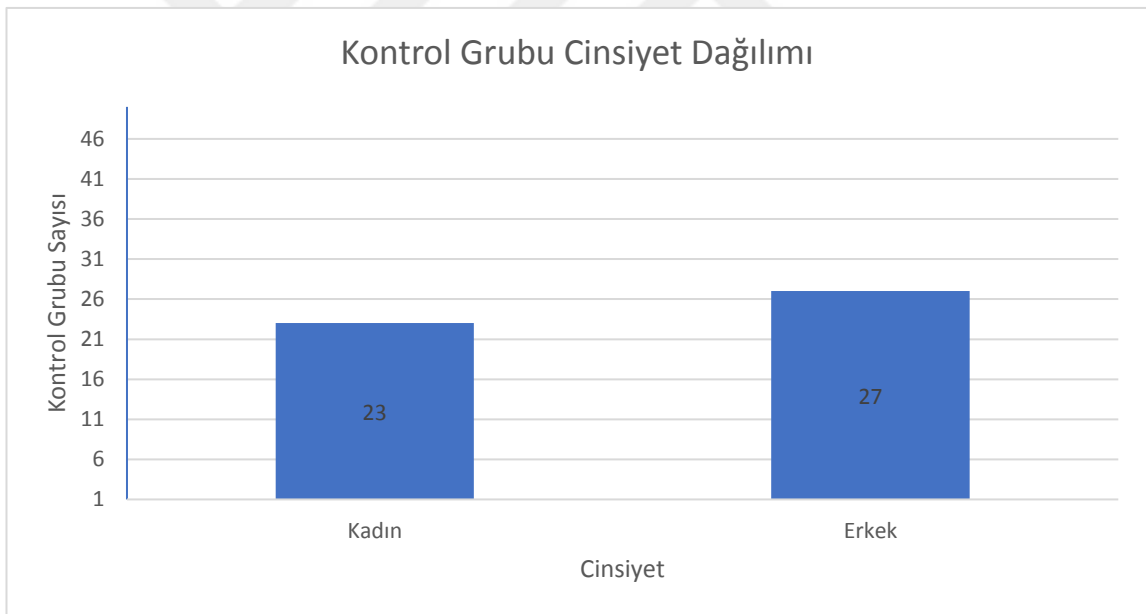
Şekil 4.1 Hasta grubu örneklerine ait yaş dağılımı grafiği



Şekil 4.2 Çalışmadaki hasta grubuna ait örneklerin cinsiyet dağılımını gösteren grafik



Şekil 4.3 Çalışmamızdaki kontrol grubuna ait örneklerin yaş aralığı dağılımını gösteren grafik



Şekil 4.4 Çalışmadaki hasta grubuna ait örneklerin cinsiyet dağılımını gösteren grafik

4.2. Real-Time PCR Sonuçları

4.2.1. Mikozis Fungoides Hasta Grubunda mRNA Ekspresyon Değişimleri

MF tanısı almış hasta grubumuza ve kontrol grubumuza ait olan örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Takiben cDNA sentezi başarılı bir şekilde tamamlandı. Bu

deney basamaklarından sonra Toll benzeri reseptörlerle ilişki yollarda görev alan (MyD88 bağımlı ve bağımsız) ve downstream hedeflerden, *TLR1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, MyD88, TIRAP, IRAK4, TRAF6, IRF7, TRAF3, TRIF(TICAM-1), MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 (p38), Elk1, NFkB (REL-A), IRAK1 ve TAB2* olmak üzere 25 adet genin mRNA ekspresyon değişimi Real-time PCR kullanılarak tespit edildi. PCR reaksiyonları sonucu hasta grubu ve kontrol grubundan tespit edilen ct (threshold cycle) değerleri kullanılarak gruplar arasındaki gen ekspresyon değişimleri değerlendirildi. Beta-aktin housekeeping olarak normalizasyon amaçlı kullanıldı.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında hasta grubu örneğimizdeki ekspresyon değişimleri Tablo 4.2’de gösterildiği gibi tespit edildi. Genlere ait mRNA ekspresyon değişimleri için kat artışları ve istatistiksel olarak değerlendirme sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4.2’de belirtildi. Ayrıca sonuçlar Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’da grafikler halinde sunulmuştur.

Tablo 4.2 Kontrol ve mikozis fungoides hasta grubundaki mRNA düzeyindeki gen ekspresyon değişimleri

	Gen	Kat Değişimi (Fold regulation)	P değeri (*p<0,05)
1	<i>TLR-1</i>	2,7916	0,048002*
2	<i>TLR-2</i>	2,1248	0,273587
3	<i>TLR-3</i>	12,0357	0,01283*
4	<i>TLR-4</i>	2,2083	0,038136*
5	<i>TLR-5</i>	4,7398	0,18671
6	<i>TLR-6</i>	2,6584	0,036075*
7	<i>TLR-7</i>	-1,6648	0,737823
8	<i>TLR-8</i>	5,9835	0,012184*
9	<i>TLR-9</i>	9,6624	0,007464*
10	<i>TLR-10</i>	1,0894	0,663933
11	<i>IRAK-4</i>	6,6298	0,060238

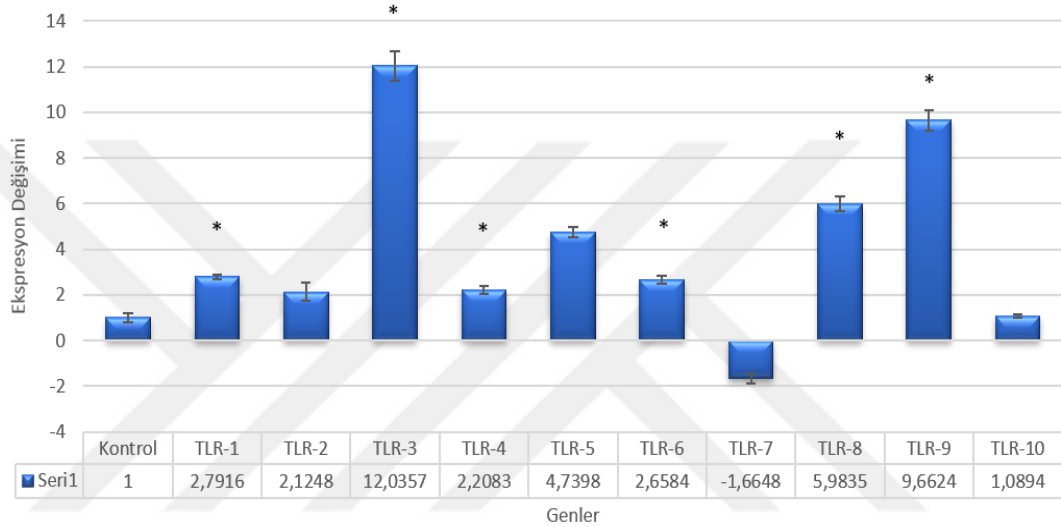
12	<i>IRF-7</i>	4,1913	0,044079*
13	<i>MyD88</i>	1,8002	0,396758
14	<i>TRAF-6</i>	1,7675	0,658091
15	<i>TIRAP</i>	14,4412	0,349271
16	<i>TRAF-3</i>	2,544	0,047355*
17	<i>TRIF (TICAM-1)</i>	3,2654	0,018875*
18	<i>MEK1</i>	2,7159	0,0357182*
19	<i>MEK2</i>	8,0323	0,0313897*
20	<i>ERK1</i>	2,8811	0,920872
21	<i>ERK2</i>	2,0144	0,683917
22	<i>Elk1</i>	2,1464	0,037471*
23	<i>NfκB</i>	3,5565	0,015469*
24	<i>IRAK1</i>	2,0265	0,13653
25	<i>TAB2</i>	1,1131	0,87711

Elde ettiğimiz sonuçlara göre mikozis fungoides tanılı hasta grubunda Toll benzeri reseptörlerin gen ekspresyonunda oldukça önemli bir artışın olduğu tespit edilmiştir. *TLR-1*; 2,7 kat, *TLR-2*; 2,1 kat, *TLR-3*; 12,03 kat, *TLR-4*; 2,2 kat, *TLR-5*; 4,7 kat, *TLR-6*; 2,6 kat, *TLR-8*; 5,9 kat, *TLR-9*; 9,6 kat artış göstermiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde *TLR-1,-3,-4,-6,-8* ve *-9* genlerinde mRNA düzeyindeki artışlar anlamlı bulunurken ($p < 0.05$), *TLR-2* ve *-5* genlerinde mRNA düzeyindeki artışlar anlamlı olarak tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Ayrıca hasta grubunda *TLR-7* mRNA ekspresyonunda 1,66 katlık bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p > 0.05$). *TLR-10* ekspresyonunda gruplar arasında bir önemli bir değişim gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Toll benzeri reseptörleri ile ilişkili yollarda görev alan aracı proteinler ve hedef genlerin de değerlendirildiği çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre hasta grubunda kontrolle kıyaslandığında, *IRAK-4*; 6,6 kat, *IRF-7*; 4,1 kat, *MyD88*; 1,8 kat, *TRAF-6*; 1,7

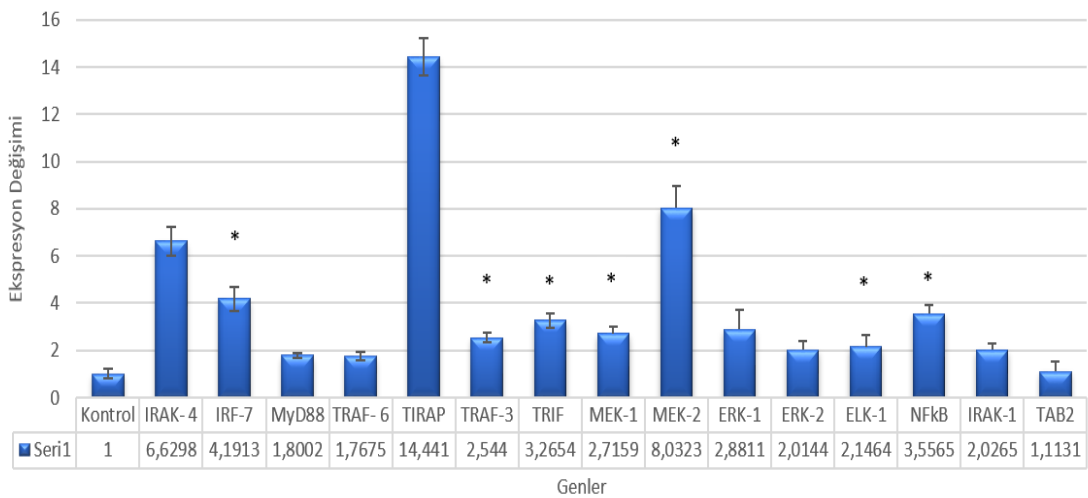
kat, *TRAF-3*; 2,5 kat, *TIRAP*; 14,4 kat, *TRIF (TICAM-1)*; 3,2 kat, *MEK-1*; 2,7 kat, *MEK-2*; 8 kat, *ERK-1*; 2,8 kat, *ERK-2 (p38)*; 2 kat, *Elk-1*; 2,1 kat, *NF κ B (Rel-A)*; 3,5 kat, *IRAK-1*; 2 kat şeklinde mRNA ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. *TRIF*, *TRAF-3*, *IRF-7*, *MEK-1*, *MEK-2*, *Elk-1*, *NF κ B* istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bulunurken *IRAK-4*, *MyD88*, *TRAF-6*, *TIRAP*, *ERK1*, *ERK2*, *IRAK-1* ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). *TAB-2* mRNA ekspresyonunda gruplar arasında bir önemli bir değişim gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

MF Hasta Grubunda Toll Benzeri Reseptörlerin mRNA Ekspresyon Değişimi



Şekil 4.5 MF hasta grubunda Toll Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Değişimleri (*:($p < 0.05$)

MF Hasta Grubunda Toll Benzeri Reseptörlerle İlişkili Genlerin mRNA Ekspresyon Değişimi



Şekil 4.6 MF hasta grubunda Toll Benzeri Reseptörlerle İlişkili Ekspresyon Değişimleri (*:($p < 0.05$)

4.2.2. Mikozis Fungoides Hücre Hattında mRNA Ekspresyon Değişimleri

Tez çalışması kapsamında hasta grubuna ek olarak MF hücre hattı ile *in vitro* koşullarda bu hastalığa ait hücre hattı modeli ile de Toll benzeri reseptörler ve yine bu yolakla ilişkili görev alan genler ve downstream hedeflerindeki genlerin mRNA ekspresyon değişimleri RT-PCR ile araştırıldı. Bu kapsamda MJ hücre hattı ve kıyaslama amaçlı BJ hücre hattından RNA izolasyonunu takiben cDNA sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. RT-PCR ile *TLR1,2,3,4,5,6,7,8,9,10, MyD88, TIRAP, IRAK4, TRAF6, IRF7, TRAF3, TRIF(TICAM-1), MEK1, MEK2, ERK1, ERK2 (p38), Elk1, NFkB (REL-A), IRAK1, TAB2 ve JNK1* olmak üzere 26 adet genin mRNA ekspresyon değişimi tespit edildi. PCR reaksiyonları sonucu MJ ve BJ hücre hatları için tespit edilen ct (threshold cycle) değerleri kullanılarak gruplar arasındaki gen ekspresyon değişimleri değerlendirildi. Beta-aktin housekeeping olarak normalizasyon amaçlı kullanıldı.

Kontrol hücre hattı olan BJ ile kıyaslandığında mikozis fungoides hücre hattı olan MJ hücre hattındaki ekspresyon değişimleri Tablo 4.3'te gösterildiği gibi tespit edildi. Genlere ait mRNA ekspresyon değişimleri için kat artışları ve istatistiksel olarak değerlendirme sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4.3'te belirtildi. Ayrıca sonuçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de grafikler halinde sunulmuştur.

Tablo 4.3 MJ mikozis fungoides hücre hattının BJ hücre hattı ile karşılaştırıldığında mRNA düzeyindeki gen ekspresyon değişimleri

	Gen	Kat Değişimi (Fold regulation)	P değeri (*p<0,05)
1	<i>TLR-1</i>	15,4679	0,00144*
2	<i>TLR-2</i>	-1,0485	0,78359
3	<i>TLR-3</i>	1,3018	0,10818
4	<i>TLR-4</i>	3,8799	0,00407*
5	<i>TLR-5</i>	-14,1224	0,07515
6	<i>TLR-6</i>	-3,9425	0,6452
7	<i>TLR-7</i>	-4,0541	0,5035

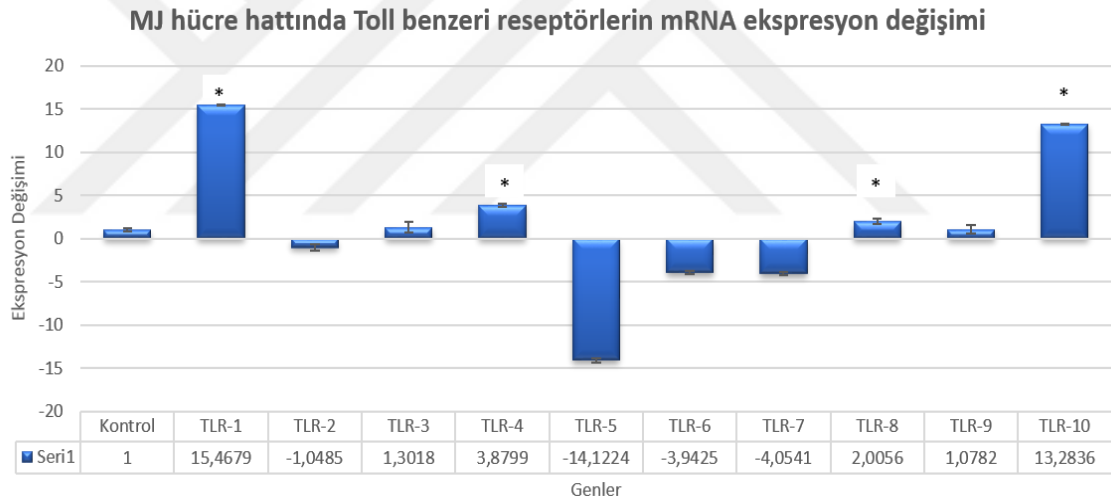
“Devamı arkada”

8	<i>TLR-8</i>	2,0056	0,01025*
9	<i>TLR-9</i>	1,0782	0,5054
10	<i>TLR-10</i>	13,2836	0,00112*
11	<i>IRAK-4</i>	15,8307	0,00117*
12	<i>IRF-7</i>	1,6239	0,04512*
13	<i>MyD88</i>	-1,1269	0,39261
14	<i>TIRAF-6</i>	7,8415	0,07561
15	<i>TIRAP</i>	3,9789	0,00352*
16	<i>TRAF-3</i>	3,9526	0,00271*
17	<i>TRIF (TICAM-1)</i>	-2,0178	0,00141*
18	<i>MEK1</i>	1,9534	0,01206*
19	<i>MEK2</i>	4,0329	0,00274*
20	<i>ERK1</i>	1,9743	0,01344*
21	<i>ERK2</i>	7,932	0,00178*
22	<i>Elk1</i>	19,937	0,00726*
23	<i>NFkB</i>	7,9085	0,00194*
24	<i>IRAK1</i>	7,8237	0,07565
25	<i>JNK1 (MAPK8)</i>	1.6	0.015*
26	<i>TAB2</i>	3,9554	0,00281*

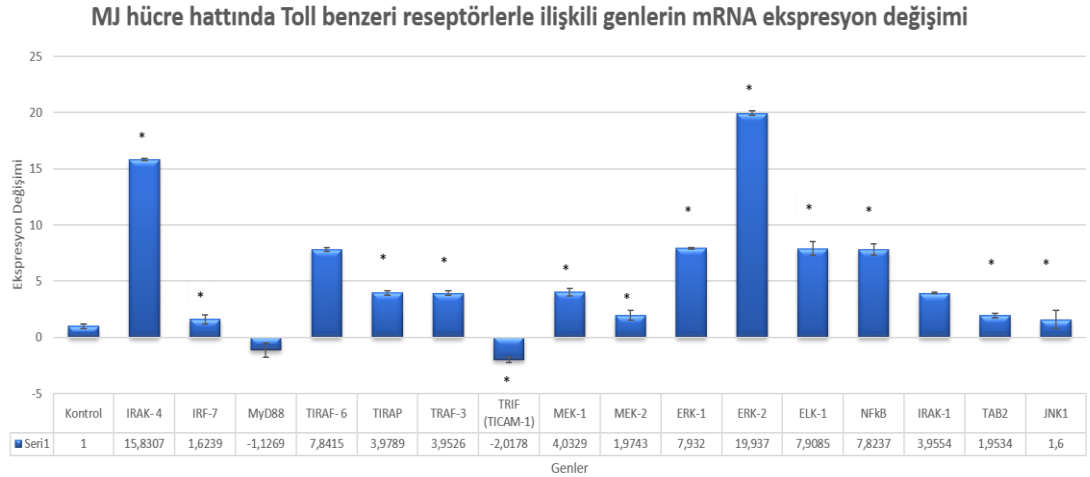
Elde ettiğimiz sonuçlara göre mikozis fungoides hücre hattı olan MJ de Toll benzeri reseptörlerin bazılarında gen ekspresyonunda oldukça önemli bir artışın olduğu belirlendi. *TLR-1*; 15,4 kat, *TLR-3*; 1,3 kat, *TLR-4*;3,8 kat, *TLR-8*; 2 kat, *TLR-10*; 13,2 kat artış göstermiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde *TLR-1,-4,-8 ve-10* genlerinde mRNA düzeyindeki artışlar anlamlı bulunurken ($p<0.05$), *TLR-3* geninde mRNA düzeyindeki artış anlamlı olarak tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda

TLR-5; 14,1 kat, *TLR-6*;3,9 kat, *TLR-7*; 4 kat mRNA ekspresyonunda bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalmalarda ise istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır($p>0.05$). *TLR-2* ve *TLR-9* ekspresyonunda gruplar arasında bir önemli bir değişim gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Toll benzeri reseptörleri ile ilişkili yollarda görev alan aracı proteinler ve hedef genlerin de değerlendirildiği çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre hasta grubunda kontrolle kıyaslandığında, *IRAK-4*; 6,6 kat, *IRF-7*; 4,1 kat, *MyD88*; 1,8 kat, *TRAF-6*; 1,7 kat, *TRAF-3*; 2,5 kat, *TIRAP*; 14,4 kat, *TRIF (TICAM-1)*; 3,2 kat, *MEK-1*; 2.7 kat, *MEK-2*; 8 kat, *ERK-1*; 2.8 kat, *ERK-2 (p38)*; 2 kat, *Elk-1*; 2.1 kat, *NF κ B (Rel-A)*; 3.5 kat, *IRAK-1*; 2 kat şeklinde mRNA ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. *TRIF*, *TRAF-3*, *IRF-7*, *MEK-1*, *MEK-2*, *Elk-1*, *NF κ B* istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bulunurken *IRAK-4*, *MyD88*, *TRAF-6*, *TIRAP*, *ERK1*, *ERK2*, *IRAK-1* ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). *TAB-2* mRNA ekspresyonunda gruplar arasında bir önemli bir değişim gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

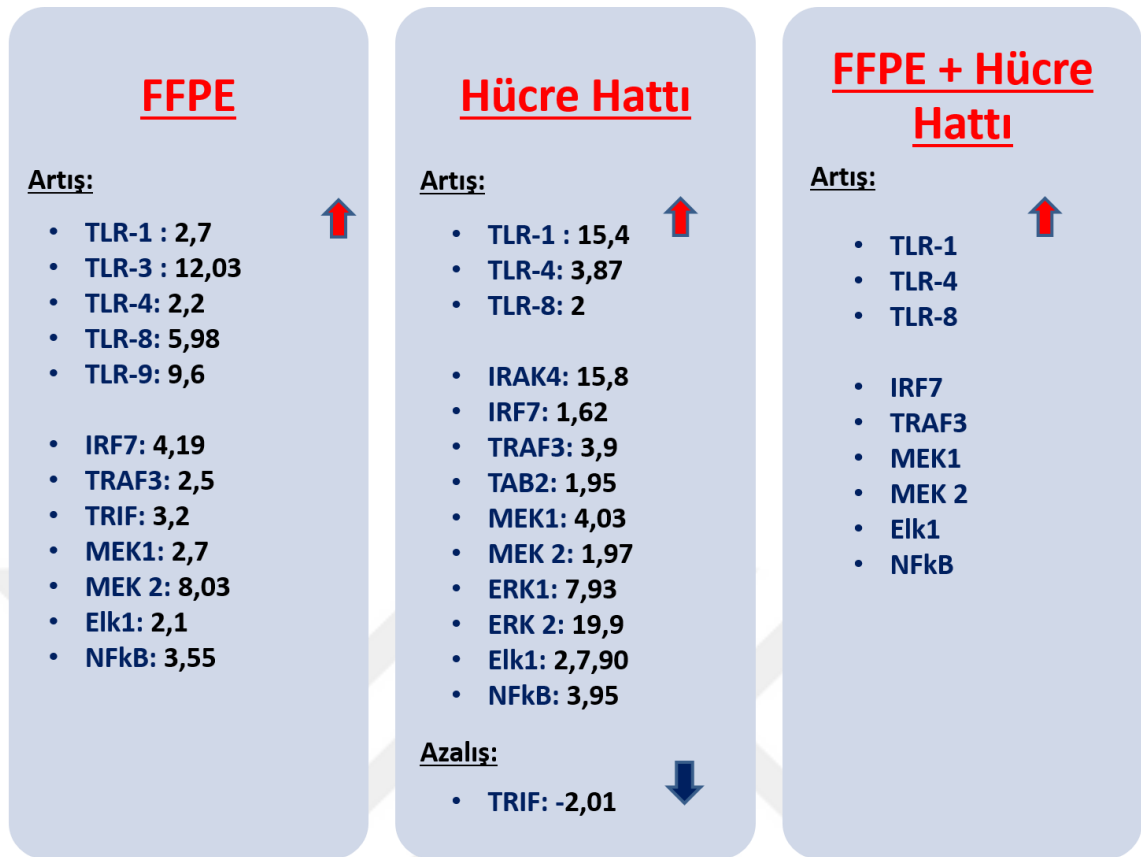


Şekil 4.7 MJ Hücre Hattında Toll Benzeri Reseptörlerin Ekspresyon Değişimleri (*: $p<0.05$)



Şekil 4.8 MJ Hücre Hattında Toll Benzeri Reseptörlerle İlişkili Genlerin Ekspresyon Değişimleri (*:p<0.05)

Hasta grubu parafin blok materyalinden elde edilen sonuçlarla mikozis fungoides hücre hattı olan MJ'deki sonuçlar karşılaştırıldığında, TLR-1, TLR-4, TLR-8, IRF7, TRAF3, MEK1, MEK2, ELK1 ve NF κ B'nin ekspresyon artışları hem hasta örneklerinde hem de hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genler olarak tespit edildi. Şekil 4.9'da hasta örneklerinde, hücre hattında ve her ikisinde ortak olarak anlamlı ekspresyon değişimi gösteren genler gösterildi.



Şekil 4.9 Hasta örnekleri ve hücre hattında anlamlı değişim gösteren genlerin karşılaştırılması

4.2.3. Mikozis Fungoides Hasta Grubunda miRNA Ekspresyon Değişimleri

MF tanısı almış hasta grubumuza ve kontrol grubumuza ait olan örneklerden total RNA izolasyonu ve takiben miRNA cDNA sentezi başarılı olarak gerçekleştirildi. Bu tez çalışması kapsamında miRNA cDNA sentezini takiben, mikozis fungoides hasta örneklerinde kontrole göre Toll benzeri reseptörler ile ilişki yolakta rol aldığı bilinen mikro RNA'ların ekspresyonları Real-Time PCR ile tespit edildi. Çalışmamızda araştırılan 13 adet miRNA primerleri sırasıyla *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-200a-3p*, *hsa-miR-223-3p*, *hsa-miR-224-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-424-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-210-3p* ve *hsa-miR-204-5p* şeklindedir. PCR reaksiyonları sonucu hasta grubu ve kontrol grubundan tespit edilen ct (threshold cycle) değerleri kullanılarak gruplar arasındaki gen ekspresyon değişimleri değerlendirildi. *U6* çalışmamızda normalizasyon amaçlı housekeeping miRNA olarak kullanıldı.

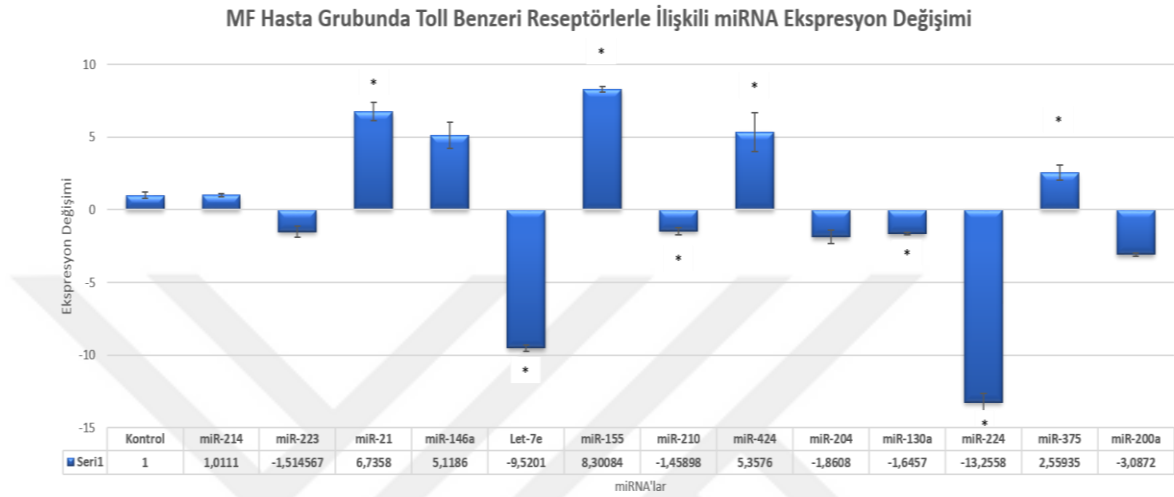
Kontrol grubu ile kıyaslandığında hasta grubu örneğimizdeki ekspresyon değişimleri Tablo 4.4'te gösterildiği gibi tespit edildi. Genlere ait mRNA ekspresyon değişimleri için kat artışları ve istatistiksel olarak değerlendirme sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4.4'te belirtildi. Ayrıca sonuçlar Şekil 4.10'da grafikler halinde sunulmuştur.

Tablo 4.4 Kontrol ve mikozis fungoides hasta grubundaki miRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri

	miRNA	Kat Değişimi (Fold regulation)	P değeri (*p<0,05)
1	<i>miR-214</i>	1,0111	0,85862
2	<i>miR-223</i>	-1,514567	0,05972
3	<i>miR-21</i>	6,7358	0,03224*
4	<i>miR-146a</i>	5,1186	0,581
5	<i>Let-7e</i>	-9,5201	0,019954*
6	<i>miR-155</i>	8,30084	0,02678*
7	<i>miR-210</i>	-1,45898	0,02837*
8	<i>miR-424</i>	5,3576	0,00878*
9	<i>miR-204</i>	-1,8608	0,16785
10	<i>miR-130a</i>	-1,6457	0,001*
11	<i>miR-224</i>	-13,2558	0,00711*
12	<i>miR-375</i>	2,55935	0,03229*
13	<i>miR-200a</i>	-3,0872	0,47744

Elde edilen sonuçlara göre hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, mikozis fungoides tanısı alan hasta örneklerinde miR-21'in 6,7 kat, miR-155'in 8,3 kat, miR-424'ün 5,3 kat, miR-375'in 2,5 katlık artışı ve miR-210'un 1,4 kat, miR-130a'nın 1,6 kat, miR-224'ün 13,2 kat ve let-7e'nin 9,5 kat ekspresyon azalışı istatistiksel olarak

anlamli bulunmuştur ($p < 0.05$). miR-214 ekspresyonunun gruplar arasında herhangi bir değişimin olmadığı tespit edilmiş fakat bu durum istatistiksel olarak anlamli bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ayrıca hasta grubunda, miR-146a için 5 katlık bir ekspresyon artışı ile miR-204 ekspresyonundaki 1.8 katlık ve miR-200a ekspresyonundaki 3 katlık ekspresyon azalışı tespit edilmiş olup bu değişimler de istatistiksel olarak anlamli bulunmamıştır ($p > 0.05$).



şekil 4.10 Mikozis fungoides tanılı hastaların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında miRNA ekspresyon değişimi

4.2.4. Mikozis Fungoides Hücre Hattında miRNA Ekspresyon Değişimleri

Tez çalışması kapsamında hasta grubuna ek olarak MF hücre hattı ile *in vitro* koşullarda bu hastalığa ait hücre hattı modeli ile de Toll benzeri reseptörler ve yine bu yolakla ilişkili olan miRNA'ların ekspresyon değişimleri çalışıldı. BJ ve MJ hücre hatlarından total RNA izolasyonu ve takiben miRNA cDNA sentezi başarılı olarak gerçekleştirildi. Bu tez çalışması kapsamında miRNA cDNA sentezini takiben, MF hücre hattında Toll benzeri reseptörler ile ilişki yolakta rol aldığı bilinen mikro RNA'ların ekspresyonları Real-Time PCR ile tespit edildi. Çalışmamızda araştırılan 13 adet miRNA primerleri sırasıyla *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-200a-3p*, *hsa-miR-223-3p*, *hsa-miR-224-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-424-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-210-3p* ve *hsa-miR-204-5p* şeklindedir. PCR reaksiyonları MJ ve BJ hücre hatlarında tespit edilen ct (threshold cycle) değerleri

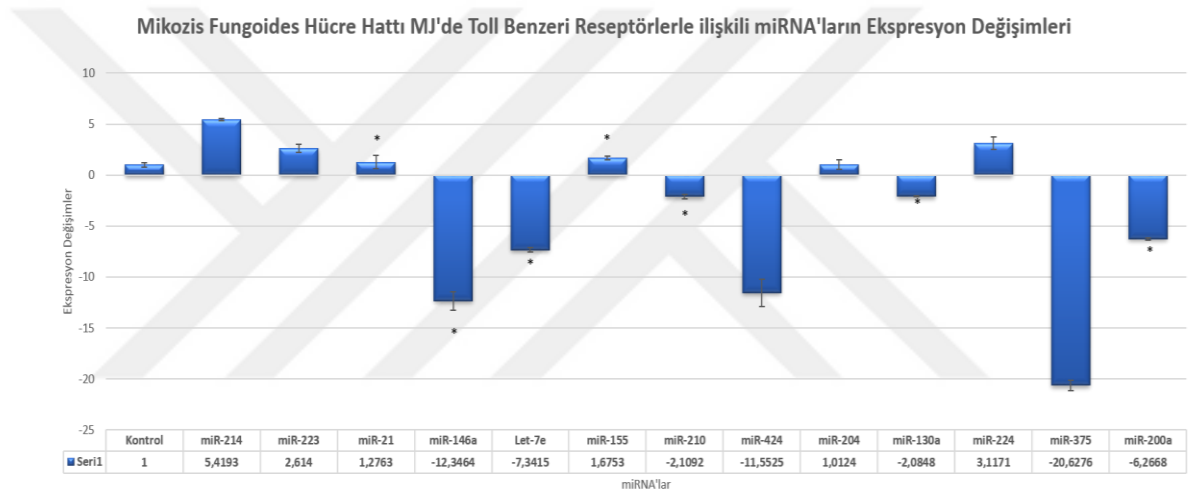
kullanılarak gruplar arasındaki gen ekspresyon değişimleri değerlendirildi. U6 çalışmamızda normalizasyon amaçlı housekeeping miRNA olarak kullanıldı.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında MF hücre hattı olan MJ örneğimizdeki ekspresyon değişimleri Tablo 4.5'te gösterildiği gibi tespit edildi. Genlere ait mRNA ekspresyon değişimleri için kat artışları ve istatistiksel olarak değerlendirme sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4.5'te belirtildi. Ayrıca sonuçlar Şekil 4.11'de grafikler halinde sunulmuştur.

Tablo 4.5 MJ hücre hattında kontrolle kıyaslandığında miRNA düzeyindeki ekspresyon değişimleri

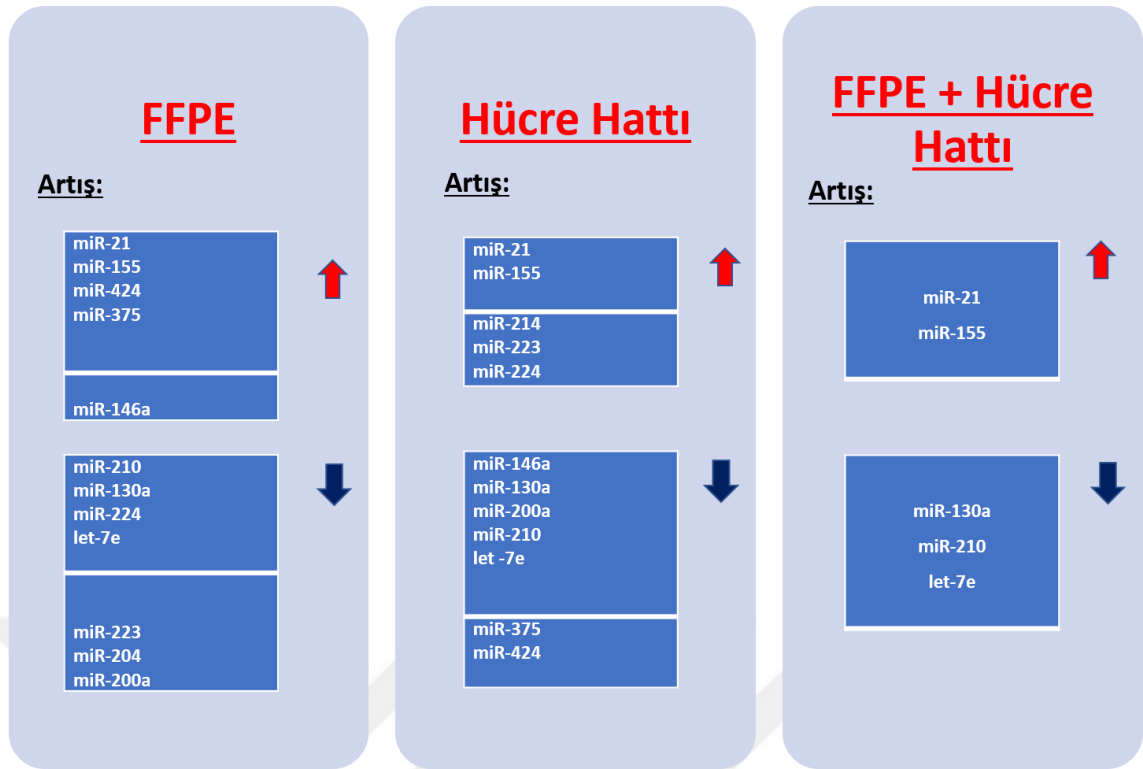
	miRNA	Kat Değişimi (Fold regulation)	P değeri (*p<0,05)
1	<i>miR-214</i>	5,4193	0,171957
2	<i>miR-223</i>	2,614	0,06719
3	<i>miR-21</i>	1,2763	0,000189*
4	<i>miR-146a</i>	-12,3464	0,00025*
5	<i>Let-7e</i>	-7,3415	0,0486*
6	<i>miR-155</i>	1,6753	0,00745*
7	<i>miR-210</i>	-2,1092	0,0473*
8	<i>miR-424</i>	-11,5525	0,65
9	<i>miR-204</i>	1,1124	0,056
10	<i>miR-130a</i>	-2,0848	0,00025*
11	<i>miR-224</i>	3,1171	0,32
12	<i>miR-375</i>	-20,6276	0,1
13	<i>miR-200a</i>	-6,2668	0,0036*

Elde edilen sonuçlara göre MF hücre hattı MJ ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, MJ hücrelerinde miR-21'in 1,27 kat, miR-155'in 1,6 katlık ekspresyon artışları ve miR-146a'nın 12,3 kat, let-7e'nin 7,3 kat, miR-210'nun 2,1 kat, miR-130a'nın 2 kat ve miR-200a'nın 6,2 katlık ekspresyon azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). miR-204 ekspresyonunun gruplar arasında herhangi bir değişimin olmadığı tespit edilmiş fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ayrıca MJ hücre hattı grubunda miR-214'ün 5,4 kat, miR-223'ün 2,6 kat ve miR-224'ün 3,1 katlık ekspresyon artışları ile miR-424'ün 11,5 kat ve miR-375'in 20 katlık ekspresyon azalışları azalışı tespit edilmiş olup bu değişimler de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.11 Mikozis fungoides hücre hattı MJ'deki kontrole kıyasla miRNA ekspresyon değişimleri

Hasta grubu parafin blok materyalinden elde edilen sonuçlarla mikozis fungoides hücre hattı olan MJ'deki sonuçlar karşılaştırıldığında, miR-21 ve miR-155 ekspresyonlarındaki artışlar ile miR-130a, miR-210 ve let-7e ekspresyonlarındaki azalışlar hem hasta örneklerinde hem de hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren genler olarak tespit edildi. Şekil 4.12'de hasta örneklerinde, hücre hattında ve her ikisinde ortak olarak anlamlı ekspresyon değişimi gösteren genler gösterildi.



Şekil 4.12 Hasta örnekleri ve hücre hattında anlamlı değişim gösteren miRNA'ların karşılaştırılması

4.3. miRNA Hedef Tespiti ve Etkileşim Analizi

Tez çalışması kapsamında çalışılan miRNA'ların hedefledikleri genlerin tespiti miR-Tarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) ve Diana Tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) veri tabanları ve içerisinde yer alan mirPath v.3 tarama programı (<http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tahmini ve valide olarak sonuçları ortaya koyan bu veri tabanlarının kullanılması ile *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-200a-3p*, *hsa-miR-223-3p*, *hsa-miR-224-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-424-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-210-3p* ve *hsa-miR-204-5p* için hedef tespitleri yapılmıştır. Hedef tespiti sırasında elde edilen genlerden sadece Toll benzeri reseptörler ve Toll benzeri reseptör yolağıyla ilişkili olan genler seçilmiştir. miRTarbase ve Diana Tools veri tabanları veri tabanlarından elde edilen sonuçlar Tablo 4.6'da belirtilmiştir.

Tablo 4.6 Çalışılan miRNA'ların miRTarbase ve Diana Tools veri tabanlarındaki olası hedef mRNA'ları

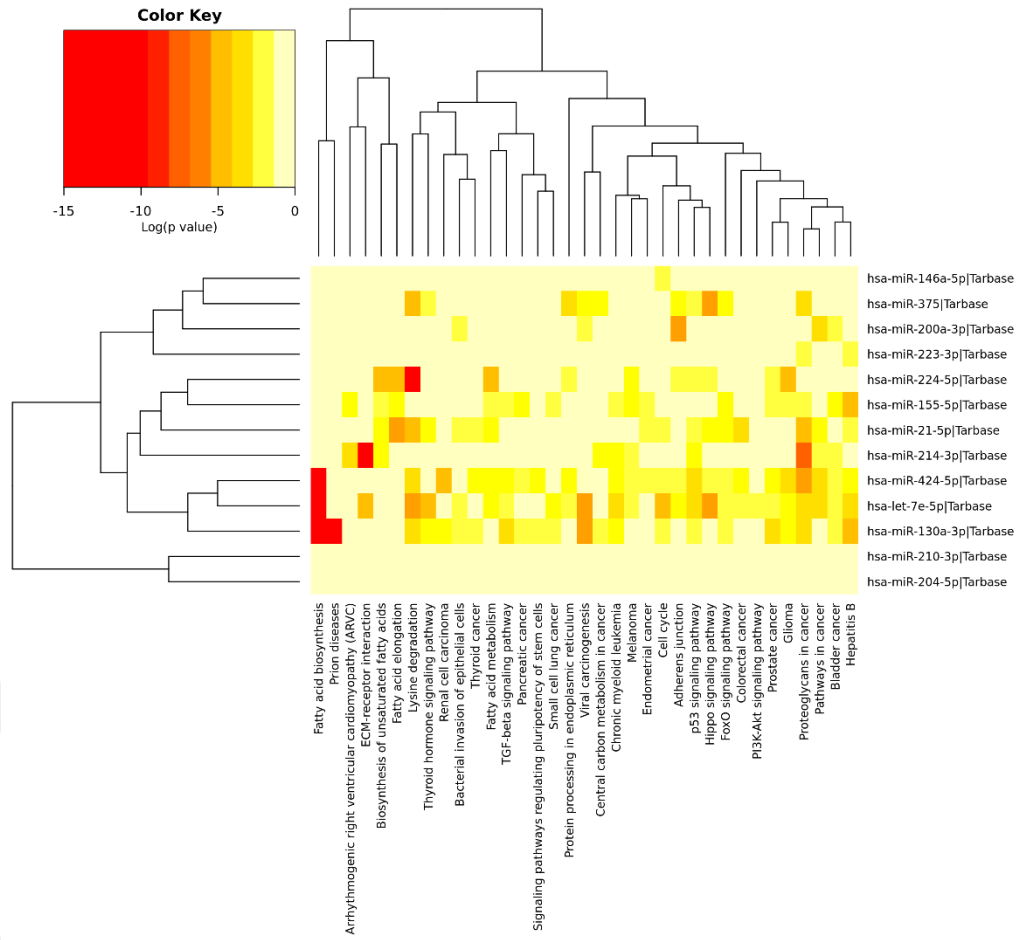
<i>miRNA</i>	<i>miRTarbase ve Diana Tools veri tabanları</i>	<i>miRNA</i>	<i>miRTarbase ve Diana Tools veri tabanları</i>
<i>hsa-miR-214-3p</i>	<i>Elk1</i>	<i>hsa-miR-424-5p</i>	<i>MAPK2 (MEK1)</i>
<i>hsa-miR-223-3p</i>	<i>TLR2</i>	<i>hsa-miR—204-5p</i>	<i>MAPK2 (MEK1)</i>
<i>hsa-miR-21-5p</i>	<i>TLR3, TLR4, IRAK1, NFkB, MyD88</i>	<i>hsa-miR-130a-3p</i>	<i>TLR6</i>
<i>hsa-miR-155-5p</i>	<i>TAB2, MyD88</i>	<i>hsa-miR—224-5p</i>	<i>MEK2</i>
<i>hsa-miR-146a-5p</i>	<i>TLR2, TLR4, IRAK1, IRF7, TRAF6</i>	<i>hsa-miR-375</i>	<i>ERK1 ve ERK2</i>
<i>hsa-let-7e-5p</i>	<i>TLR4</i>	<i>hsa-miR-200a-3p</i>	<i>NFkB</i>
<i>hsa-miR- 210-3p</i>	<i>NFkB</i>		

Çalışılan miRNA'ların (*hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-200a-3p*, *hsa-miR-223-3p*, *hsa-miR—224-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-424-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR- 210-3p* ve *hsa-miR—204-5p*) görev aldığı veya ilişkili olduğu sinyal iletim yolları ile moleküler etkileşim ve ilişkileri analiz etmeye ve açıklamaya çalışan veri tabanı olan KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri tabanı (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) kullanılarak tespit edildi. Ayrıca çalışılan mRNA'lar ile string analizi (<https://string-db.org/>) yapılarak Toll benzeri reseptörler arasındaki ilişki ve etkileşimi teyit edildi. Yapılan KEGG analizi doğrultusunda tez çalışması kapsamında araştırılan miRNA'ların çok çeşitli hücresel yollarla ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında en güçlü ilişkilerin olduğu yollar Tablo 4.7'de belirtildiği gibi TNF sinyal yolağı, yağ asidi metabolizması, viral karsinogenez, kanser yolları, TGF-beta sinyal yolağı, mTOR yolağı, NFkB sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı, kanser ilişkili proteoglikanlar ve tez çalışmamızın çalışılan ana sinyal yolağı olan Toll benzeri reseptör sinyal yolağı olarak tespit edildi. Çalışılan miRNA'lar Toll benzeri reseptör yolağından 42 gen ile ilişkili bulunmuştur. Bu tablo da

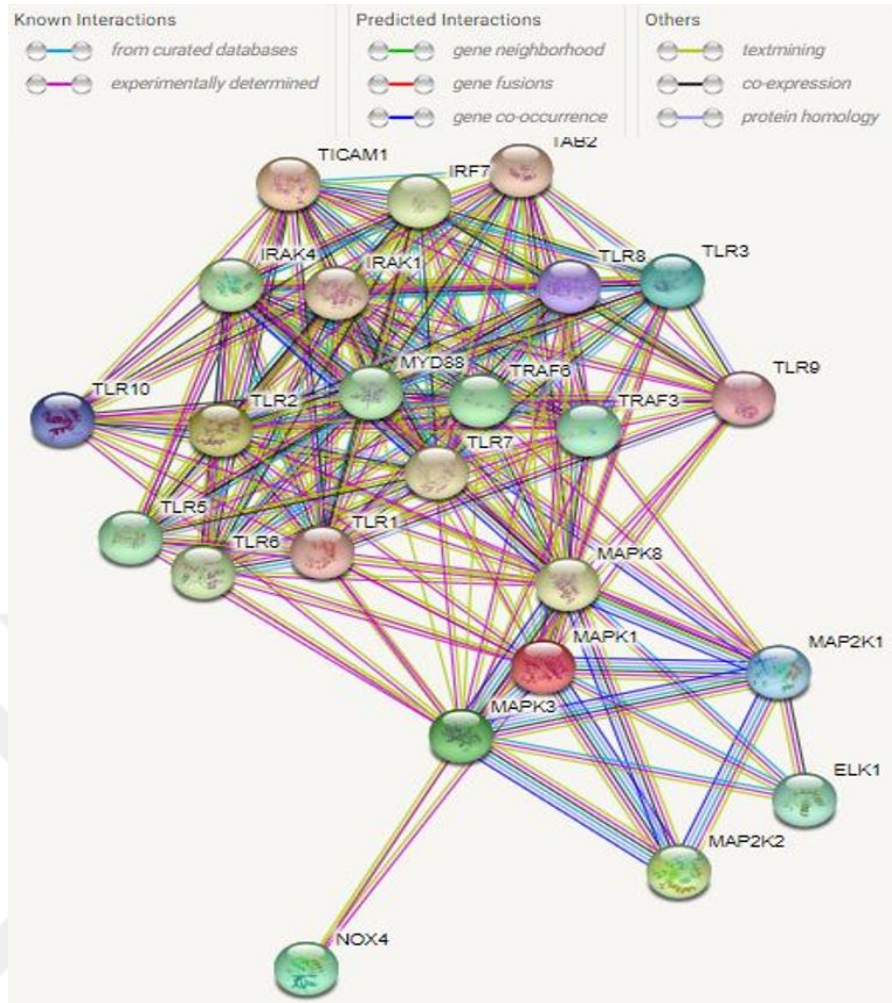
ayrıca kaç tane miRNA'nın ilişkili bulunan yollardaki görev alan genlerden kaç tanesi ile ilişkili olduğu da ortaya koyulmaktadır. Şekil 4.13'te KEGG yolak analizi sonucu ortaya çıkan heatmap analizi verilmiştir. KEGG yolak analizi Diana Tools online tarama ve analiz programı içerisinde yer alan mirPath v.3 tarama programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Ayrıca Şekil 4.14'te çalışmada kullanılan genlerin string analizi yapılarak aralarındaki protein-protein etkileşim durumu gösterilmiştir (<https://string-db.org/>). Bu etkileşimin içine ayrıca miRNA'lar da katılarak string tabanı kullanılarak çalışan Rain: RNA-protein arasındaki ilişki, bağlantı ve etkileşim ve yolak analizini yaparak ortaya koyan veri tabanı (https://rth.dk/resources/rain/single_search.php?identifier=&organism=Human&submit=Search) ile analiz işlemi yapıldı. Böylece seçilen miRNA'lar ile Toll benzeri reseptörler ve bu yolda görev alan genler arasındaki etkileşim ve ilişki bu veri tabanı ile de teyit edilmiştir (Şekil 4.15). Ancak bu veri tabanının tahmini ve valide hedefler noktasında güncelliği miR-Tarbase ve Diana Tools analizinde tespit edilen hedef ve etkileşimleri tam olarak ortaya koymakta yetersiz kalabilmekte diğer veri tabanlarında etkileşimli çıkan miRNA ve hedef genleri ve proteinlerini tam olarak ortaya koyamamaktadır. Veri tabanındaki yakın zamanda yapılacak olan güncellemeler doğrultusunda muhtemelen bu problem ortadan kaldırılacaktır.

Tablo 4.7 Çalışmada kullanılan miRNA'lar'ın KEGG yolak analizi

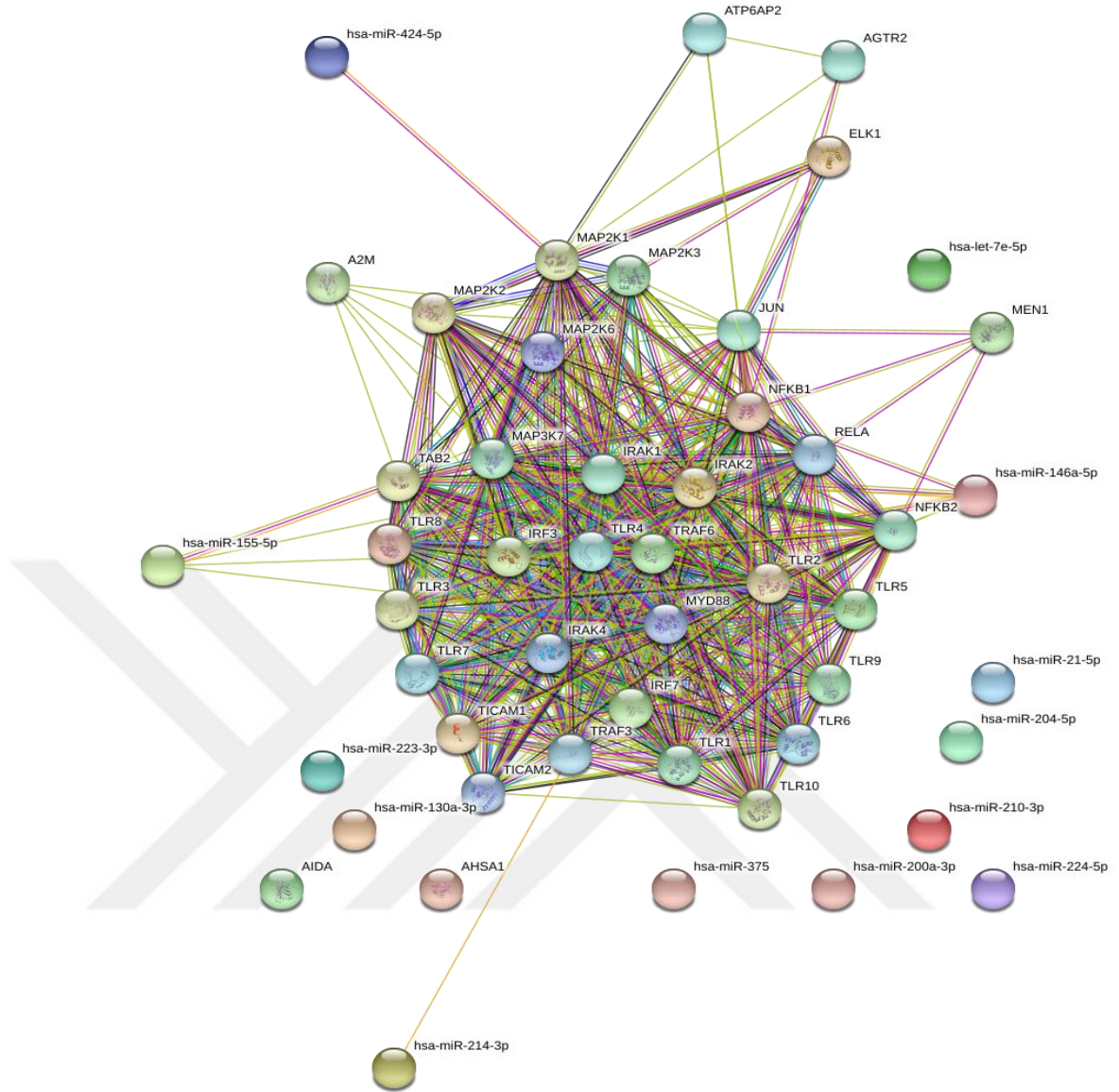
KEGG Yolağı	P Değeri	Gen Sayısı	miRNA Sayısı
TNF Sinyal Yolağı (hsa04668)	1.89362792542e-07	72	12
Yağ Asidi Metabolizması (hsa01212)	1.89362792542e-07	23	11
Viral Karsinogenez (hsa05203)	8.11346678209e-07	107	12
Kanser Yolakları (hsa05200)	1.05780864732e-05	207	12
TGF-beta sinyal Yolağı	2.30253084465e-06	48	11
mTOR sinyal yolağı (hsa04150)	0.000192783519889	41	12
NF-kappa B sinyal yolağı (hsa04064)	0.010406299652	45	11
MAPK sinyal Yolağı (hsa04010)	0.00542322653832	107	8
Toll-like reseptör sinyal Yolağı	0.0438939871019	42	8
Kanser ilişkili proteoglikanlar	4.46945232842e-10	100	8
...



Şekil 4.13 Çalışmada kullanılan miRNA'ların KEGG heatmap analizi sonucu



Şekil 4.14 Çalışılan genlerin protein-protein etkileşimini gösteren string analizi sonucu

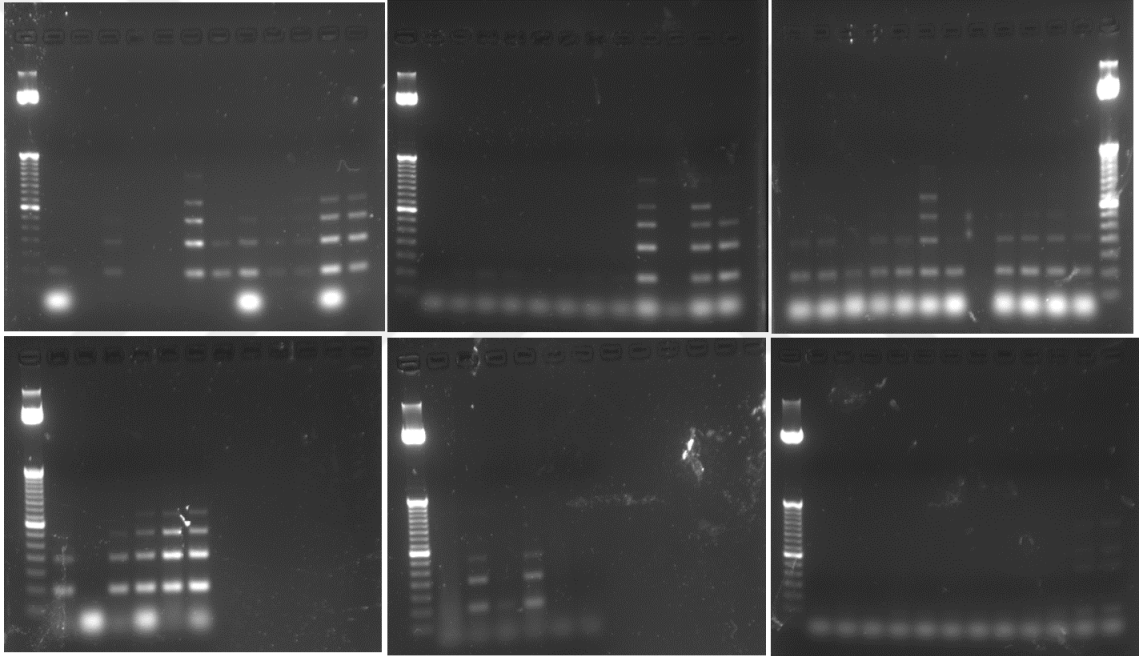


Şekil 4.15 Çalışılan genlerin protein-RNA etkileşimini gösteren string analizi sonucu

4.4. T Hücre Klonalitesi Sonuçları

Invivoscribe IdentiClone™ T Cell Receptor Gamma Gene Rearrangement Assay 2.0 kiti ile Biomed-2 primerleri kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile T hücre reseptörü Gama için yapılan klonalitesi tespit edildi. Hasta grubundan izole edilen DNA'ların klonalite deneyleri için kalite kontrolü ve seçimi yapıldı. Kaliteli bir değerlendirme yapabilmek için çalışılacak olan DNA'nın özellikle 300 baz çiftinden küçük olmaması deneyi kolaylaştırmaktadır. DNA'ların 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 ve 1:20 dilisyonları kullanılarak klonalite için uygun baz çiftli DNA'lar seçilmeye çalışıldı. Elde edilen DNA seçim sonuçlarına göre 27 örneğimizin DNA'sı için seçilen konsantrasyonlarda klonalite deneyi

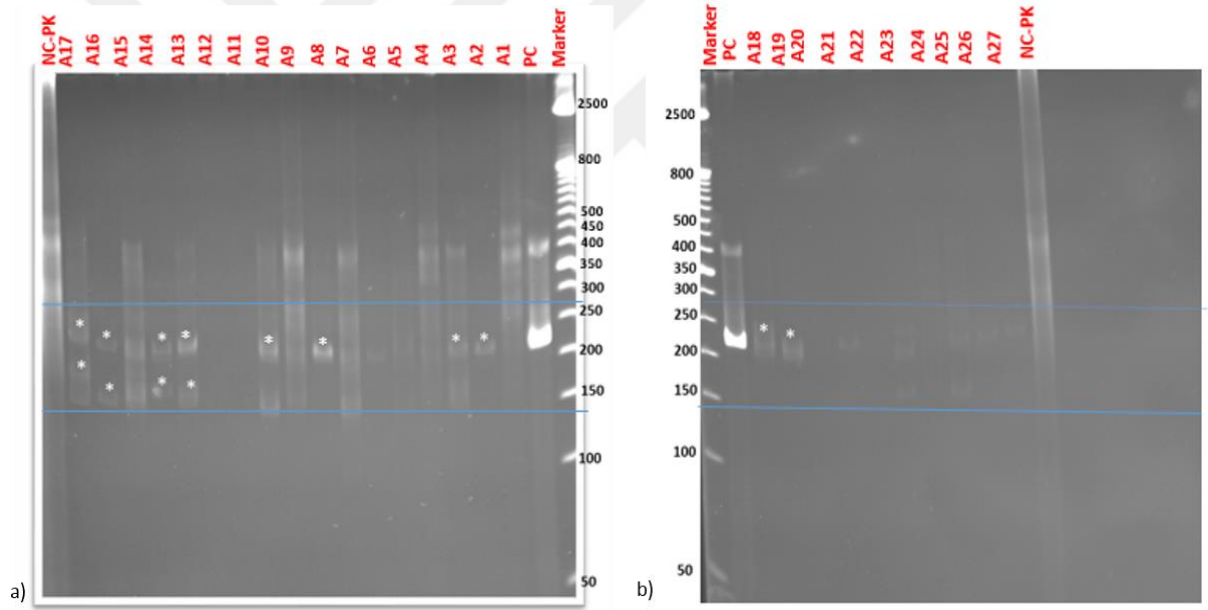
için sonuç elde edilebildi (Şekil 4.16). Takiben gerçekleştirilen multipleks PCR ile klonalite çalışmalarına devam edildi. Yalancı pozitifliği engellemek için heterodupleks analizi yapılmış olup takiben poliakrilamid jel elektroforezi ile jel yürütme işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra jel görüntüleme sisteminde jel görüntülenerek ve fotoğrafı çekildi. Çekilen fotoğraftaki bantların büyüklüklerine ve analiz aralıklarına bakılarak her hasta için T hücre reseptörü gama klonalitesi değerlendirildi. Elde edilen jel görüntüleme sisteminde UV görüntülerinde simir şeklindeki görüntüler poliklonal PCR ürünü olarak değerlendirildi. Analiz aralığında tespit edilen tek bant görüntüleri “klonal” PCR ürünü olarak, aynı analiz aralığında tespit edilen iki bant biallelik ve farklı analiz aralığında tespit edilen çoklu bantlar da “oligoklonal” olarak değerlendirildi. Pozitif ve negatif kontrollerin jelde yüklenerek sistem kendi içinde kontrol edildi. Şekil 4.17 ve 4.18’ de poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri analiz bandı ve bantlar işaretlenerek belirtildi.



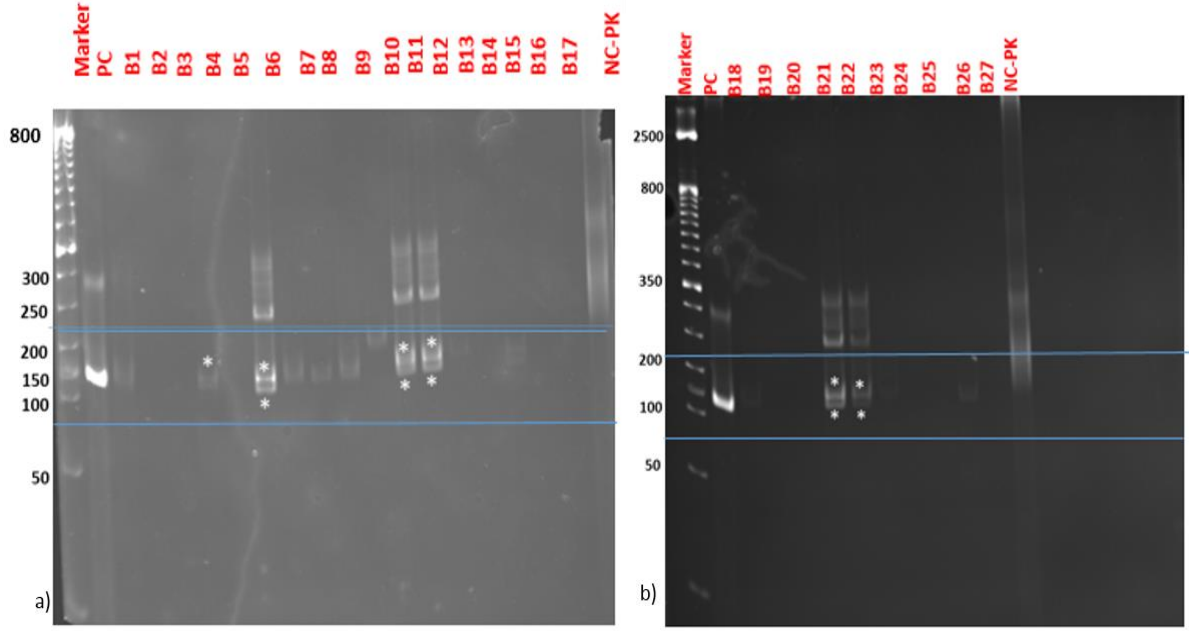
Şekil 4.16 DNA örneklerinin T hücre reseptörü gama klonalitesi belirlenmesi için agaroz jelde kaliteli DNA’ların tespiti

Çalışmamızda gerçekleştirilen T hücre reseptörü gama klonalitesi deneyindeki yürütülen poliakrilamid jel elektroforezinin UV görüntülemesi üzerinden yapılan analiz aralığındaki değerlendirildiğinde 27 olguda, tube A için TCRA ve Tube B için TCRB olmak üzere gerçekleştirilen iki reaksiyonda; TCRA reaksiyonu için analiz aralığında A09 pozitif kontrol örneği için analiz bandı 212, B21 poliklonal negatif kontrol için analiz bandı 167’dir. TCRA ve TCRB için analiz aralığı olan 145-255 ve 80-220 için Bant gözlenen jel fotoğrafları yıldız (*) ile işaretlenmiştir. Bu olgulardan TCRA için; A2, A3, A8, A10, A18

ve A19 örnek numaralı toplam 6 adet olgu da tespit edilen tek yıldız ile gösterilen ve analiz aralığında tek bantla izlenen örnekler monoklonal olarak değerlendirildi. A13, A14, A16 ve A17 numaralı örneklerde iki yıldız ile gösterilen ve aynı analiz aralığında iki bant gözlenen 4 adet olgumuz biallelik olarak tespit edildi. Diğer 17 adet olguda TCRA için analiz aralığında bant gözlemlendi ve poliklonal olarak değerlendirildi. TCRB reaksiyonu için 27 olgudan B4 olarak numaralandırılan örnekte analiz aralığında tek bant gözlemlendi ve monoklonal olarak değerlendirildi. B6, B10, B11, B21 ve B22 olarak numaralandırılan 5 olguda aynı analiz bandında iki bant gözlemlendi ve biklonal olarak değerlendirildi. Diğer 21 örnek için analiz aralığında bant gözlemlenmedi ve poliklonal olarak değerlendirildiği. TCRA ve TCRB ortak değerlendirildiğinde 27 olgunun 15'inde (%55,5) monoklonal ve biklonal olarak değerlendirildi. Diğer 12 örnek (%44,5) poliklonal olarak değerlendirildi. Yaş ve cinsiyet ile klonal farklılık arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.17 Çalışılan olguların TCRA için poliakrilamid jel görüntüleri



Şekil 4.18 Çalışılan olguların TCRB için poliakrilamid jel görüntüleri

5. TARTIŞMA

Deride bulunan malign klonal CD4⁺ T lenfositlerle karakterize bir hastalık grubu olan primer kutanöz T hücreli lenfomalar, batı ülkelerindeki 1/100000 olarak belirtilmiş yıllık insidansı ile en sık karşılaşılan lenfoma tipidir (Keehn vd 2007, Willemze vd 2018). Kutanöz T hücreli lenfomaların %60'ını kapsayan alt tipi olan Mikozis fungoides (MF)'in patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. MF, etyopatogenezinde immünolojik, çevresel ve genetik olarak bazı parametrelerin etkili olduğu hipotezleri ortaya atılmakla birlikte hastalığın altında lenfositlerin papiller dermiste farklı yoğunluklarda infiltr olmaları ve bu T lenfosit hücrelerinin epidermise ilerlemesi ile karakterize olan Non-Hodgkin lenfoma formudur (Willemze vd 2019, Kandolf Sekulović vd 2009, (Yamashita vd 2012).

Mikozis fungoidesin uzun yıllar önceki keşfinden bu yana KTHL'nin patofizyolojisinin altında yatan moleküler mekanizmalar araştırılmış olup elde edilen güncel sonuçlar arasında kronik antijen stimülasyonu, endojen veya eksojen onkogenik virüsler gibi enfeksiyöz süreçler, T hücre reseptöründe somatik V (D) J rekombinasyonunda kullanılan RAG1/RAG2 endonükleaz aktivitesinin reaktivasyonu, THR klonalitesi ve UV (Ultraviyole) ışınımı dahil edildi (Peterson vd 2019). Genel olarak, uzun süreli antijen stimülasyonunun, anahtar sitokin sinyal yolları yoluyla, T hücresi çoğalması ile inflamatuvar bir tepkiye neden olduğu ve sürekli genişleme ile klonal bir malign T hücresine yol açtığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda, yüksek verimli transkripsiyonel profillemeden toplanan veriler kullanılarak, KTHL'nin karmaşık patogenezi anlamak için moleküler patogenezin anlaşılmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Stadler ve Stranzenbach 2018). Tüm bu elde edilen bulgulara rağmen henüz tam olarak hastalığın patogenezinin aydınlatılması malign hücrelerde ve mikro çevrelerinde daha detaylı genetik ve fonksiyonel araştırmaları beraberinde getirmiştir. Gen dizileme çalışmaları ve diğer genetik çalışmalar ile mikozis fungoides ve kutanöz T hücreli lenfoma patogenezinde onkogenler, tümör baskılayıcı genler, kromotin yapısında yer alan ve epigenetik mekanizmalarla ilişkili olan genler, T hücre olgunlaşmasında ve aktivasyonunda rol alan genlerin de dahil olduğu yaygın olarak etkilenen genlerdeki kopya sayılarındaki artışlar, bu genlerdeki mutasyonlar, ekspresyon değişimleri ve ilişkili sinyal iletim yollarında meydana gelen aktivasyon veya inaktivasyonların olduğu ortaya koyulmuştur (McGirt vd 2015, Peterson vd 2019).

Yapılan araştırmalarda MF ve diğer KTHL tiplerinde bu biyolojik mekanizmalarda görev alan hücre transkripsiyonel profillerinden TP53, PTEN, BRAF, MYC, RB1, CDKN2A, FAS gibi hücre döngüsü ve apoptoz gibi hücreysel mekanizmalarda, ARID1A,

DNMT3A, CTCF, ATM gibi kromatin modifikasyonu ve DNA tamiri gibi biyolojik mekanizmalarda ve ZEB1, NFKB2, PLCG1, STAT3, CD28, JAK2 gibi T hücre gelişimi ve fonksiyonlarında görevleri genlerde meydana gelen mutasyonların olduğu rapor edilmiştir (Choi vd 2015, da Silva Almeida vd 2015, McGirt vd 2015). Yine ortaya koyulan çalışmalar kapsamında MF ve KTHL çeşitlerinde T hücre farklılaşmasında rol alan TOX, BCL11A, SATB1, CD40, GATA3, JUNB, STAT4 genlerinde, T hücre aktivasyonu ve sinyal iletiminde görev alan NFKB-2, FYB, LCK, KIR3DL2, PTPRCAP genlerinde, hücre migrasyonunda rol alan CCR4, SATB1, EPHA4, DNMT3, PLS3 gibi genlerde ve apoptoz ile ilişkilendirilen BCL2, MCL1, STAT3, TWIST1, FAS gibi genlerin ekspresyonlarında meydana gelen anormal değişimler ortaya koyulmuştur (Dulmage ve Geskin 2013, Litvinov vd 2015). Aynı şekilde, KTHL patogenezi ile ilgili daha spesifik genetik ve fonksiyonel değişiklikler üzerine odaklanan çalışmalar hücre sağ kalımı ve proliferasyonu gibi biyolojik olaylarda meydana gelen moleküler değişiklikleri ortaya koymaya çalışmaktadır. JAK-3 / STAT ve NFKB sinyal yollarının düzensizliği T hücre proliferasyonuna ve kronik aktivasyonuna yol açtığı ortaya koyulmuştur. JAK-3 / STAT yolunun SOCS3 ve protein tirozin fosfataz SHP1 gibi negatif düzenleyicilerinin işlev bozukluklarının KTHL patogeneziinde rol aldığı rapor edilmiştir (Sibbesen vd 2015). Ayrıca JAK/STAT sinyal yolağının atopik dermatit, psoriasis gibi inflamatuvar deri hastalıklarında ve mikozis fungoides ve sezary sendromu gibi neoplastik deri hastalıklarının patogeneziinde rol aldığı değerlendirilmiştir (Karagianni vd 2019). Torres ve arkadaşları tarafından yapılan bir genomik analiz araştırmasında JAK/STAT sinyal inhibitörlerinden HNRNPK ve SOCS1'in delesyonlarının CDKN2A delesyonundan sonra mikozis fungoides'de en sık karşılaşılan genetik değişiklik olduğunu belirtilmiştir (Bastidas Torres vd 2018).

Mikozis fungoides hastalığında JAK/STAT yolağı dışında yapılan diğer bir yolak incelemesi analizinde TNF sinyal iletim yolağında görevli çeşitli genlerin deregülasyonları da rapor edilmiştir. Tracey ve arkadaşları tarafından 29 MF hastası ile yapılan mikroarray çalışmasında 27 genin MF tümörogenezindeki etkili olabileceği bildirilmiştir. Yapılan ekspresyon profil tespiti çalışmasında TNF yolağı ve T hücre aktivasyonunda görev alan genlerin mikozis fungoides'de ekspresyonlarının upregüle olduğunu belirtmişlerdir (Tracey vd 2003). Dereure ve çalışma ekibi tarafından yapılan bir diğer çalışmada da FAS sinyal yolağındaki defektin MF patogeneziinde T hücrelerinin apoptoz mekanizmalarını üzerinden olası bir etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir (Olivier Dereure vd 2002). CD4+ kutanöz T hücreli lenfoma hastalarında periferik kan hücreleri üzerine yapılan diğer çalışmada FAS ekspresyonun bu hastalarda düşük olduğu gösterilmiştir (O Dereure vd 2000). MF hastalarında apoptoz ve hücre döngüsünün

regülasyonunda görev alan genlerdeki ekspresyon değişimleri de hastalığın patogenezinde etkili olabileceği ortaya atılmıştır. Mao ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada *bcl-2* protein ekspresyonundaki artış (Mao vd 2014) ve Peris ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da *p16* mRNA ekspresyonunda azalma olduğu tespit edilmiş olup bu değişimlerin MF hastalığında rol oynayabileceği rapor edilmiştir (Peris vd 1999). Hu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, keokin reseptörlerinden biri olan CCR7 ekspresyonunun MF deri lezyonlarında subkutan tutulum ile korele olduğunu göstermişler ve ek olarak, CCR7'nin aktivasyonunun mTOR sinyal yolu boyunca mikozis fungoides hücre hattı olan MyLa hücrelerinde hücre göçünü indüklediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar bağlamında, CCR7'nin MF patogenezinde rol oynayabileceğini ve CCR7'yi hedeflemenin gelecekte mikozis fungoides tedavisi için çekici bir terapötik yaklaşım olabileceğini rapor etmişlerdir (Hu vd 2014). Bu literatür bilgileri özetlendiğinde mikozis fungoides hastalığının moleküler patogenezi ile yapılan çalışmalar kapsamında JAK/STAT, FAS, TNF, mTOR, NFkB gibi çeşitli sinyal iletim yollarında görev alan genlerin ekspresyon değişimleri bu genlerde meydana gelen mutasyon veya delesyon gibi kromozomal değişimlerin etkili olabileceği belirtilmiştir.

Vücudun korunmasında önemli immünolojik işlevlere sahip olan deri dokusu fiziksel bariyer görevi görenin yanında patojen tespitinde önemli rollere sahiptir. Derinin bu konak savunma mekanizmasında çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı geliştirilen doğal immün cevabın oluşumunda görevli olan TLR'ler ilgili ligandları tanıyarak inflamasyon oluşumunu tetikler. TLR uyarımı hücre için moleküler sinyal iletim yollarını aktive ederek anti-mikrobiyal genlerin ve inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu uyarır. TLR'lerin otoimmün hastalıklar, diyabet, renal iskemi reperfüzyon gibi çeşitli hastalıkların yanı sıra atopik dermatit, psoriasis, akne vulgaris gibi dermatolojik hastalıklara da yol açabildiği öne sürülmüştür (Güven ve Can 2012). Pek çok dermatolojik hastalığın TLR sinyali ile ilişkili olduğu bu yolda görevli genlerde meydana gelen defektlerin bu hastalık tiplerinde hastalığa yatkınlığı arttırdığı ve hastalık seyrini etkilediği belirtilmiştir. Doğal immün yanıtın oluşmasında esas olarak monositler, NK hücreleri, lenfositler, dendritik hücreler gibi hücre tiplerinin rol oynadığı ve bu hücrelerinde TLR eksprese ettikleri bildirilmiştir (Karaca ve Öztürk 2012).

Günümüzde şu ana kadar insanlarda tespit edilmiş olan 10 Toll benzeri reseptörden, TLR-1'in triaçil lipopeptitlere karşı oluşan yanıtta TLR-2 ile fonksiyonel olarak ilişkili olarak beraber hareket ettiği bildirilmiştir (Takeda ve Akira 2005). TLR-2 gram pozitif ve negatif bakterilerinin hücre duvarlarında bulunan lipoproteinler ve lipoteik asit gibi mikrobiyal komponentleri tanıyabilen reseptörler olup TLR-6 ile beraber dimer oluşturarak aktivasyon göstermektedir (Underhill ve Ozinsky 2002). *In vivo* olarak

yapılan çalışmalarda TLR-3'ün baskılandığı farelerde viral RNA kopyalarına karşı verilen hücresel yanıtın azaldığı gösterilmiş olup bu çalışmalar sonucunda TLR-3'ün dsRNA'nın tanınması ve yanıt olarak tip I interferon üretiminden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Takeda ve Akira 2005). Toll benzeri reseptörler arasında en çok çalışılan ve diğer tiplerine göre en çok bilginin elde edildiği TLR-4'ün lipopolisakkarit başta olmak üzere ayrıca endojen moleküllerden ısı şok proteini 60 (HSP60)'ı ve diğer bir endojen faktör olan fibronektinin de TLR-4 tarafından tanındığı gösterilmiştir (Agnese vd 2002, Okamura vd 2001). TLR-2, -4, -6 çeşitli bakteriyel komponentlere cevap olarak aktive olurken, TLR-5 ve TLR-9'un aktivasyonunun tek bir mikrobiyal hedefin spesifik olarak tanınmasıyla ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. TLR5 bakteriyel flagellinin tanınmasından ve sonucunda TNF alfa gibi faktörlerin sinyallerin üretiminden sorumludur (Takeda ve Akira 2005). TLR-7'nin imidazoquilin ailesi üyelerini tanıdığı ve interferon alfa ve IL-12 gibi sitokinlerin uyarımı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Akira 2003). TLR-8 ile ilgili yapılan çalışmalarda tek zincirleri RNA'nın tanınması ve sitokin salınımda görev aldığı gösterilmiş ve ayrıca TLR-7 ve TLR-9 ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (Peng vd 2005, Takeda ve Akira 2005). TLR-9'un bakteri veya virüs DNA'sı ile metillenmemiş CpG dinükleotidlerini tanıdığı ve B hücre proliferasyonunun stimülasyonu ile dendritik hücreler ve makrofaj hücrelerinin aktive edilmesinde de görev aldığı tespit edilmiştir (Akira 2003, Takeda ve Akira 2005). TLR-10 ile ilgili yapılan çalışmalar ve bilgimiz kısıtlı olup TLR-1 ve TLR-6 ile aminoasit benzerliği olduğu gösterilmiştir. Direk olarak etkileşiminin olduğu ligand henüz tespit edilememiş olup fonksiyonu ile ilgili kesin bir bilgi de bulunmamaktadır (Oosting vd 2014).

Tez çalışmamızın konusu oluşturan mikozis fungoides hastalığı da CD4+ T hücrelerinden köken alan kutanöz T hücreli lenfoma tipidir. Bu araştırma kapsamında TLR'lerin MF hastalarındaki ekspresyon değişimleri çok sayıda yolak elmanı da araştırılarak bütüncül olarak ele alınmıştır. Bu kapsamda bu çalışmada, Toll benzeri reseptörler ile ilişkili olan ve bu yolakta görev alan genler ile downstreamdeki hedef genlerin ekspresyonlarının ve aynı zamanda bu yolakta görev alan miRNA'ları hem mikozis fungoides hasta grubunda hem hücre hattında kontrole göre farklılık göstereceği ve patogenez aydınlatılması açısından bilgiler sunacağı hipotez olarak ortaya koyulmuştur. Hipotezin desteklenmesi amacıyla hasta grubu ve kontrol grubu olarak iki olgu grubu planlanmış ve aynı zamanda mikozis fungoides hücre hattı da kullanılarak hasta grubu ile hastalığa ait hücre grubunda da benzer sonuçların olup olmadığı araştırılmıştır.

Gruplar arasındaki mRNA ekspresyon değişimleri Real-Time PCR kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen çalışma sonuçlarımıza göre mikozis fungoides tanılı hasta grubunda Toll benzeri reseptörlerin gen ekspresyonunda oldukça önemli bir artışın

olduğu tespit edilmiştir. *TLR-1*; 2,7 kat, *TLR-2*; 2,1 kat, *TLR-3*; 12,03 kat, *TLR-4*;2,2 kat, *TLR-5*; 4,7 kat, *TLR-6*; 2,6 kat, *TLR-8*; 5,9 kat, *TLR-9*; 9,6 kat artış göstermiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde *TLR-1,-3,-4,-6,-8* ve *-9* genlerinde mRNA düzeyindeki artışlar anlamlı bulunurken ($p<0.05$), *TLR-2* ve *-5* genlerinde mRNA düzeyindeki artışlar anlamlı olarak tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda *TLR-7* mRNA ekspresyonunda 1,66 katlık bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalma ise istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır($p>0.05$). *TLR-10* ekspresyonunda gruplar arasında bir önemli bir değişim gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca deney sonuçlarımıza göre mikozis fungoides hücre hattı olan MJ de Toll benzeri reseptörlerin bazılarında gen ekspresyonunda değişimlerin olduğu da belirlendi. *TLR-1*; 15,4 kat, *TLR-3*; 1,3 kat, *TLR-4*;3,8 kat, *TLR-8*; 2 kat, *TLR-10*; 13,2 kat artış göstermiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde *TLR-1,-4,-8* ve *-10* genlerinde mRNA düzeyindeki artışlar anlamlı bulunurken ($p<0.05$), *TLR-3* geninde mRNA düzeyindeki artış anlamlı olarak tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Ayrıca MJ grubunda *TLR-5*; 14,1 kat, *TLR-6*;3,9 kat, *TLR-7*; 4 kat mRNA ekspresyonunda bir azalma tespit edilmiştir. Bu azalmalarda ise istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır($p>0.05$). *TLR-2* ve *TLR-9* ekspresyonunda gruplar arasında önemli bir değişim gerçekleşmemiş ve istatistiksel olarak da anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Literatürde yapılan çalışmalar dikkate alındığında mikozis fungoides ve TLR ilişkisini araştıran çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Elde edilen sonuçlarımızı bunlarla karşılaştırdığımızda literatüre benzer bazı sonuçlar elde edilmiştir. 2006 yılında Jarrouse ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen mikozis fungoides ve sezary sendromlu hastalarda parafine gömülü dokudan yapılan çalışmada immünohistokimyasal yöntemle TLR -2, -4 ve -9'un ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Bu çalışmada normal deri dokusu, atopik dermatit ve psoriasis olguları kontrol amaçlı kullanılmıştır. Çalışma sonucunda normal dokuya kıyasla parapsöriasis dokularında bu üç TLR'nin ekspresyonunun kontrole göre değişmediğini ancak MF derilerindeki epidermis kısmında TLR -2, -4 ve -9 için immünohistokimyasal boyama sonucunda kontrole kıyasla oldukça güçlü ekspresyon artışı tespit etmişlerdir. Sezary sendromunda ise normale göre yüksek ama MF dokularından daha az ekspresyon yoğunluğu gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda MF cilt lezyonlarının gelişiminde T lenfositlerinin kronik aktivasyonunda rol oynayabilen kutanöz lezyonlarda TLR2, TLR4 ve TLR9 ekspresyonundaki bir artışla hastalık patogenezi arasında pozitif ilişki görülmüştür (Jarrouse vd 2006). Çalışmamız sonucunda da MF hasta grubunda RT-PCR ile yapılan ekspresyon değişimi tespitinde TLR-2 ekspresyonunda 2,1 kat, TLR-4 ekspresyonunda 2,2 kat ve TLR-9 ekspresyonunda da 9,6 katlık artışlar tespit

edilmiştir. TLR-4 ve -9'un ekspresyonlarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Jarrousse ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ekspresyon artışları belirtilmiş ama ne kadarlık bir artışın olduğu kat sayısal olarak rapor edilmemiştir.

Mikozis fungoides hastalarında TLR ekspresyonu ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise Mısır'da 28 kişilik bir MF hasta grubunda 11 erkek ve 17 bayan olacak şekilde bir olgu grubunda RT-PCR yöntemi kullanılarak TLR-7 ekspresyon değişimi değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 30 kontrole göre 28 kişilik MF ve 30 kişilik psöriais hasta grubunda araştırma yapılmış olup ve MF vakalarında TLR7-ekspresyonunun daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Psöriasis grubundaki TLR-7 ekspresyon değişimi kontrole göre çok farklılık göstermemişken MF grubuna göre daha yüksek ekspresyon tespit edilmiştir. Ayrıca MF grubunda, yaşa ve cinsiyete bağlı olarak TLR 7 ekspresyonunda anlamlı bir değişim saptanamamıştır. TLR-7'nin MF vakaları için kullanışlı bir prognostik belirteç olma potansiyeli olduğunu öne süren araştırmacıların daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğunu, western blot ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak da PCR verilerinin teyit edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmanın sadece 28 hasta grubu olgusu içermesi çalışmanın en büyük eksikliğini oluşturmaktadır (El Tawdy vd 2017). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak TLR-7 ekspresyonunun hasta grubunda 1,66 ve hücre hattı grubumuzda da 4 katlık bir azalma gösterdiği fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. TLR-7 imidazoquinolin ailesinden farklı tipleri tanıyan sonucunda IFN- α ve IL-12 gibi sitokinleri uyaran reseptördür (İnci ve Bişkin 2007). MF grubunda düşük ekspresyon sergilemesine rağmen inflamatuvar sitokinlerdeki artışın diğer TLR'ler aracılığıyla gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Primer kutanöz CD30+ anaplastik büyük hücreli lenfomada (cALCL) ve tip C lymphomatoid papulosis (LyP-C) patogenezi üzerine yapılan bir araştırmada TLR-2,-4,-7,-9 aktivasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Parafine gömülü blok materyalinden 16 cALCL ve 3 LyP-C hasta örneğinden immunohistokimyasal boyama ile ekspresyon durumları tespit edilmiştir. Ekspresyon durumlarını zayıf, orta ve güçlü şeklinde belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda, normal kontrol dokusu epidermisinde TLR-2, -4,-7,-9 ekspresyonlarını zayıf olarak tespit etmişlerdir. Kutanöz lezyonlardaki epidermiste TLR-2, TLR-4 ve TLR 7 ekspresyonlarını güçlü düzeyde olduğu ve sırasıyla hasta grubunda %58 (11/19), %58 (11/19) ve %74 (14/19) oranlarında ekspresyon düzeyleri tespit etmişlerdir. TLR-9 ekspresyonu ise diğerlerine göre daha düşük bulunmuştur. Hastaların %31'inde (6/19) TLR 9 ekspresyonu düşük olarak tespit edilmiştir. TLR-2,-4 ve -7 için ekspresyon değişimleri kontrole göre kıyaslandığında istatistiksel olarak

anlamli bulunurken TLR-9 için ise istatistiksel olarak anlamli bulunmamıştır (Knol vd 2009).

Bununla birlikte literatürde MF'nin farklı aşamalarının ilerleyişinde TLR ifadesinin kazancı ya da kaybını inceleyen bugüne kadar yapılmış kapsamlı bir çalışma yoktur. Sadece Kado ve arkadaşları tarafından Amerika'da 8 MF hastasında yapılan bir araştırmada parafine gömülü materyalden 4 µm'lik mikrotom kesitlerinde immunohistokimyasal skorlama yöntemi ile TLR 1-9 için ekspresyon değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen 8 hastanın erken evre MF ve iler tümöral evredeki MF grubuna göre değerlendirilmesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda TLR ekspresyonlarının evreye göre anlamli bir değişim göstermediği bulunmuştur. MF grubu kontrole göre kıyaslandığında ise bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. TLR-4,-5 ve -6 için MF grubunda güçlü boyanma tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da hasta grubunda TLR-4 ve -6'nın ekspresyon artışları tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamli bulunmuştur. Fakat Kado ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışma sadece 8 olgu kullanılarak yapıldığı için genelleme yapılamayacağı ve daha kapsamlı çalışmalarla desteklenmesi gerektiği rapor edilmiştir (Kado vd 2012).

Tüm TLR yolağı genleri hem hücre hattı hem de hasta grubu karşılaştırıldığında ortak olarak anlamli şekilde değişimin tespit edildiği reseptörler TLR-1, TLR-4 ve TLR-8 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca yolakta görev alan genler arasındaki anlamli değişimin olduğu genler IRF-7, TRAF-3, MEK-1, MEK-2, Elk-1 ve NFkB olarak belirlenmiştir. TLR aktivasyonunu takiben adaptör proteinlerin bağlanması gerçekleşir. Takiben, IRAK ve TRAF etkileşimleri gerçekleşir ve bu durum MAPK (mitogen activated protein kinaz), JNK (JUN N-terminal kinaz) ve p38 gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu tetiklenmektedir. TLR sinyal iletiminin downstream hedefleri arasındaki yer alan temel transkripsiyon faktörleri NFkB (Nüklear Faktor kappa B) ve IRF (İnterferon regulatory factor), CREB (cyclic- AMP responsive element binding protein) ve AP1 (Aktivatör Protein 1) gibi transkripsiyon faktörleridir. TLR aktivasyonu sonucunda hücrede pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin üretilmesi cevabı tetiklenir (Akira ve Takeda 2004, Kawasaki ve Kawai 2014, L. A. J. O'Neill ve Bowie 2007, Yamamoto vd 2003). Bu çalışmada da TLR-1,-4 ve -8 aktivasyonunu takiben TRAF adaptör proteininde ve takiben MAPK yolağının ve yine downstream hedeflerdeki NFkB ve IRF-7 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu takiben proinflamatuar cevabın geliştiği görülmektedir. Kado ve arkadaşlarının çalışmamız sonucuna benzer bir sonucu 8 hasta MF olgusunda immunohistokimya ile göstermişler ve p65 upregülasyonunu ortaya koymuşlardır (Kado vd 2012). Izban ve arkadaşları ile Sors ve arkadaşları da MF hastaların yaptıkları araştırmalarda NFkB yolağında aktivasyon olduğunu rapor etmişlerdir (Izban vd 2000,

Sors vd 2006) . Izban ve arkadaşları immunohistokimya yöntemi ile 24 MF vakasının 22'sinde neoplastik T hücrelerinde güçlü nükleer ve sitoplazmik p65 ekspresyon tespit etmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, kutanöz T hücreli lenfomada sağ kalım ve apoptozdan kaçış mekanizmalarının NFkB aktivasyonu ile sağlandığını öne sürmektedir (Izban vd 2000). Sors ve arkadaşları da KTHL patogeneğinde NFkB'nin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Sors vd 2006). Bizim çalışmamızda NFkB ekspresyonunun artışında TLR yolağındaki görevli genlerin aktivasyonlarının rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir.

Toll benzeri reseptör (TLR) agonistleri, KTHL'li hastalarda DC veya T hücre etkilerinin artırılması yoluyla etkili bir antitümör immün tepkisini uyarmada yeni bir yaklaşımı temsil eder (E. J. Kim vd 2005). TLR-9 agonisti olarak ticari olarak üretilen PF-3512676 (CPG 7909)'un faz I çalışmasında kutanöz T hücreli lenfomada etkinliği ile ilgili bir araştırma, çalışmayı kabul eden 28 hasta üzerinde denemiştir. PF-3512676, bakteriyel DNA'da yaygın olan metillenmemiş CPG motiflerini taklit eden ve böylece bir immün reaksiyonlar kaskadı tetikleyen ve potansiyel olarak bir antitümör immün tepkisini indükleyen sentetik, nükleaz dirençli, TLR9 aktive edici bir oligodeoksinükleotit (ODN) 'dir. Çalışma sonunda hiçbir hastada otoimmün hastalıklarla ilişkili bir semptom gelişmediği görülmüştür. Hem Index Lezyon Şiddeti Kompozit Değerlendirmesi hem de Hekim Global Değerlendirmesi tarafından belirlenen PF-3512676'ya verilen klinik yanıt oranı %32 (3 tam klinik cevap, 6 kısmi yanıt) olarak belirlenmiştir. Daha fazla hasta üzerinde çalışmanın yapılması gerekmektedir birlikte araştırmacılar bu yeni ajanın KTHL tedavisinde ve yeni antitümör immünizasyon stratejilerinde güçlü bir adjuvan olabileceğini belirtmişlerdir (Y. H. Kim vd 2010). Aynı araştırma grubu daha sonra bu TLR-9 agonistinin radyasyonla kombine halde intratumoral enjeksiyonuyla 15 mikozis fungoides hastasında *in situ* bir faz 1/2 çalışması gerçekleştirmişlerdir. Klinik cevaplar, sistemik antitümör aktivitesinin bir ölçüsü olarak uzak ve tedavi edilmeyen bölgelerde değerlendirilmiş ve klinik olarak anlamlı beş yanıt gözlenmiştir. İşlem iyi tolere edilmiş ve yan etkiler çoğunlukla hafif ve geçici enjeksiyon bölgesi veya grip benzeri semptomlardan oluşmuştur. Bağışıklanmış bölgeler, MF hücreleri veya doku düzenleyici T hücreleri olabilen CD25 +, Foxp3 + T hücrelerinde önemli bir azalma ve yine S100+, CD1a + dendritik hücrelerde de benzer bir azalma göstermiştir. Yanıt vermeyenlere karşı klinik cevaplayıcılarda CD25 + T hücrelerinin ve cilt dendritik hücrelerinin daha fazla azalmasına yönelik bir eğilim tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacıların yerinde aşılama stratejileri MF'de de uygulanabilir olarak değerlendirilmiş ve bir hasta alt grubunda meydana gelen klinik tepkiler bağlamında bu terapötik etkileri

arttırmak için modifikasyonlarla daha fazla çalışılmasını gerektiği belirtilmiştir (Y. H. Kim vd 2012).

Kutanöz T hücreli lenfomada çalışma sayısı oldukça az olmakla birlikte diğer dermatolojik hastalıklarda TLR fonksiyonları veya patogenezi ilişkisi araştırılmıştır. Örneğin bir çalışmada TLR-2, ve TLR-4'ün ekspresyonlarının yüzeysel inflamatuvar akne de yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca TLR-2 dağılımı ve keratinosit olgunlaşması arasında ilişki bulunmuştur (Jugeau vd 2005). Keratinosit hücrelerinde retinoik asit türevlerinin anti-inflamatuvar etkilerini TLR-2 ekspresyonunu azaltarak yapmakta ve bu şekilde akne tedavisinde kullanılmaktadır (Terhorst vd 2010). Psöriasis hastaların lezyonlu derilerinde keratinositlerde TLR-5 ekspresyonunun down-regüle olduğu, üst epidermis tabakasındaki keratinositlerde ise TLR-2 ekspresyonunun belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir (S. K. Kim vd 2010). Yapılan bir diğer çalışmada ise psöriasis hastalarında TLR-9 ekspresyonunun arttığı bildirilmiş olup, sağlıklı deri ile kıyas edildiğinde psöriatik derinin TLR ekspresyonları bakımından farklılığın anlamı ve hastalık patogeneziindeki rolü tam ortaya koyulamamıştır (Miller vd 2005). Gürel ve Özcan tarafından 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada, psöriatik lezyonlar ve aynı hastalara ait periferik mononükleer hücrelerdeki (PBMCs) TLR 1-10 mRNA ekspresyon değişimleri karşılaştırıldığında lezyonlu dokulardaki TLR ekspresyonlarının aynı hastaların periferik kanlarına göre daha yüksek ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. TLR-3,-5,-6,-7,-9 ve -10'un ekspresyonlarının PBMC'ye göre anlamlı şekilde lezyonlu dokuda arttığı bulunmuştur. Ayrıca sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında TLR-1,-8 ve -10 ekspresyonlarının psöriasis hastalarındaki artışları anlamlı bulunmuştur (Gürel ve Sabah-Özcan 2019). Diğer bir dermatolojik hastalık olan kutanöz leishmaniaziste TLR-4 mutant farelerde *in vivo* olarak yapılan bir çalışmada TLR-4'ün doğal ve adaptif immün yanıtı düzenlediği ortaya koyulmuştur (Kropf vd 2004). TLR-4 atopik dermatit gibi alerjik hastalıklarda da sitokin salgılanmasında rol aldığı bildirilmiştir (Petry ve Gaspari 2009). Behçet hastalığı ile ilgili bir çalışmada CD14+ monosit hücrelerinde TLR-2 ve TLR-4 düzeyleri flow sitometrik yöntemle araştırılmış ve kontrole göre kıyaslandığında ekspresyonları yüksek bulunmuş ayrıca aynı çalışmada TLR-2 ve -4 düzeyleri ile hastalık şiddeti arasında pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (Do vd 2008). cALCL, LyP-C, MF, SS gibi dermatolojik hastalıklarda TLR ekspresyonlarındaki artışların tespit edilmesi lezyonlu ciltte ortak bir patojenik mekanizma bozukluklarının olabileceğini düşündürmektedir (Knol vd 2009). Bazı çalışmalarda MF lezyonlarında keratinositlerinde Epstein-Barr virüsüne (EBV) ilişkin kanıtlar bulunması ve artan epidermal TLR ekspresyonu bu süreçte belki de keratinositleri enfekte eden kalıcı bir viral veya bakteriyel ajan tarafından tetiklenen erken bir olay olabileceği de araştırmacılar

tarafından bildirilmiştir (Dreno vd 1994, Y. H. Kim vd 2003). Ayrıca, özellikle insan T lenfotropik virüs (HTLV) başta olmak üzere, herpes simpleks virüs (HSV), insan herpes virüs 6, (HHV), ve insan immün yetmezlik virüsünün de kutanöz T hücreli lenfoma patogeneziyle ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular virüslerin primer etyolojik faktör olmaktan çok kutanöz T hücreli lenfomada immün baskılamaya ve tümör gelişimine sebep olan ikincil faktör olarak rol aldığını düşündürmektedir (Kim-James ve Heffernan 2001, Schmidt vd 2006, Zucker-Franklin ve Pancake 1994). Bu bağlamda, Toll benzeri reseptörlerin fonksiyonları ve ilişkili olduğu biyolojik olayların tespiti, kompleks yapılarının detaylı aydınlatılması hastalıkların immunopatogenezlerinin anlaşılmasında katkı sağlayacaktır. Çeşitli dermatolojik hastalıkların TLR sinyaliyle ilişkili olması ve TLR yolağında görevli genlerdeki ekspresyon değişimleri veya defeklerin bazı cilt hastalıklarında yatkınlıkla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Karaca ve Öztürk 2012). Toll benzeri reseptörler ile ilgili bilgilerimiz detaylandıkça kutanöz immunobiyolojide immün reaksiyonların nasıl düzenlendiğini anlamamızda ayrıca TLR yanıtı düzenleyerek ya da baskılayarak viral ve bakteriyel kaynaklı hastalıklardan neoplastik hastalıklara kadar çok geniş spektrumda çok sayıda dermatolojik hastalığın moleküler biyolojik mekanizmaları ve patogenezlerinin aydınlatılmasında, hastalıkların önlenmesi, hastalığa yatkınlık durumu ve tedavisi gibi konularda katkı sağlayacaktır.

Yakın zamanda KTHL patogenezinde sinyal yollarındaki görevli genlerin yanı sıra kodlamayan RNA türlerinden miRNA'ların da rol aldıkları yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. MF patogenezinde ve MF gelişiminde hastalığın altında yatan mekanizmalarla ilişkili olabileceği düşünülen miRNA'lar, mRNA degradasyonunu yöneterek ve transkripsiyon sonrası protein translasyonunu baskılayarak işlev gören, 3' UTR bölgelerinin hedef gen transkriptlerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen, 19-24 nt uzunluğunda küçük kodlamayan RNA molekülleridir (Bayraktar vd 2019, Chen vd 2013). Hücre büyümesi ve çoğalması, farklılaşması ve apoptoz gibi önemli biyolojik işlemlerde rol oynarlar. MiRNA'lar hedef genlerine bağlı olarak onkogenik veya tümör baskılayıcı özelliklere sahip olabilir (C.-Z. Chen 2005). MiRNA'ların hem solid tümörlerde hem de hematolojik malignansilerde hastalığın progresyonunda önemli olduğu ve MF dahil kanser türlerinin hepsinde anormal biçimde eksprese edildiği ortaya koyulmuştur. Son zamanlarda, miRNA'ların MF patogenezinde kilit oyuncular olduğu ve bu hastalarda bir tanı aracı olarak görev yapabileceği öne sürülmüştür (Lindahl vd 2018, Ralfkiaer vd 2011).

Bu kapsamda tez çalışmamızda biz de Toll benzeri reseptörler ile ilişki yolakta rol aldığı bilinen mikro RNA'ların ekspresyonları Real-Time PCR ile tespit edildi. Çalışmamızda araştırılan 13 adet miRNA sırasıyla *hsa-miR-146a-5p*, *hsa-miR-375*, *hsa-*

miR-200a-3p, *hsa-miR-223-3p*, *hsa-miR—224-5p*, *hsa-miR-155-5p*, *hsa-miR-21-5p*, *hsa-miR-214-3p*, *hsa-miR-424-5p*, *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-130a-3p*, *hsa-miR-210-3p* ve *hsa-miR—204-5p* olup hem hasta grubunda hem de hücre hattı MJ'de ekspresyon değişimi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, mikozis fungoides tanısı alan hasta örneklerinde miR-21'in 6,7 kat, miR-155'in 8,3 kat, miR-424'ün 5,3 kat, miR-375'in 2,5 katlık artışı ve miR-210'un 1,4 kat, miR-130a'nın 1,6 kat, miR-224'ün 13,2 kat ve let-7e'nin 9,5 kat ekspresyon azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). miR-214 ekspresyonunun gruplar arasında herhangi bir değişimin olmadığı tespit edilmiş fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda, miR-146a için 5 katlık bir ekspresyon artışı ile miR-204 ekspresyonundaki 1.8 katlık ve miR-200a ekspresyonundaki 3 katlık ekspresyon azalışı tespit edilmiş olup bu değişimler de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). MJ hücrelerinde ise miR-21'in 1,27 kat, miR-155'in 1,6 katlık ekspresyon artışları ve miR-146a'nın 12,3 kat, let-7e'nin 7,3 kat, miR-210'nun 2,1 kat, miR-130a'nın 2 kat ve miR-200a'nın 6,2 katlık ekspresyon azalışları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). miR-204 ekspresyonunun gruplar arasında herhangi bir değişimin olmadığı tespit edilmiş fakat bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca MJ hücre hattı grubunda miR-214'ün 5,4 kat, miR-223'ün 2,6 kat ve miR-224'ün 3,1 katlık ekspresyon artışları ile miR-424'ün 11,5 kat ve miR-375'in 20 katlık ekspresyon azalışları azalışı tespit edilmiş olup bu değişimler de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Ham hasta grubu hem de hücre hattı beraber değerlendirildiğinde miR-21 ve miR-155 ekspresyonlarındaki artış ile miR-130a, miR-210 ve let-7e ekspresyonlarındaki azalmaların ortak olduğu görülmüştür.

Literatürdeki veriler ışığında bizim elde ettiğimiz sonuçlardan bazıları diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. miR-155 mikozis fungoides ve KTHL hastalarında en çok çalışılan miRNA olarak dikkati çekmektedir. Kobomarsen isimli miR-155 inhibitörü bir oligonükleotidin kutanöz T hücreli lenfomada hücre proliferasyonunu azaltmak için çeşitli sinyal yollarını regüle ettiğini göstermişlerdir. Kobomarsen şuan için lösemi ve lenfoma tedavisi için miR tabanlı tedavi kapsamında faz I çalışmaları devam eden bir ajan olup KTHL tedavisinde de ileri çalışmaların yapılarak tedavide kullanılabilir bir ajan olabileceği belirtilmiştir (Seto vd 2018). Bizim sonuçlarımıza paralel olarak bazı benzer sonuçlar çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Lindal ve arkadaşları tarafından Danimarka'da gerçekleştirilen geniş kapsamlı bir çalışmada, 154 erken MF/MF şüphesi olan hastadan biyopsi örneği alınarak 20 sağlıklı kontrol grubu kullanılarak 384 miRNA'yı içeren panel ile PCR yardımıyla ekspresyon profillemesi yapılmıştır. Elde edilen

ekspresyon değişimleri analiz edildiğinde 123 miRNA'da ekspresyon değişimi saptanmıştır. 72 miRNA'nın upregüle olduğu 51 miRNA'nına downregüle olduğu belirlenmiştir. Tüm bu alışmaları "LASSO Cox regresyon model" kullanılarak kıyasladıklarında üç adet miRNA'nın erken MF'de prognostik belirteç olma durumu için en anlamlı değişim gösterdiği belirtilmiştir. Bu miRNA'lar, miR-106b-5p, miR-148a-3p ve miR-338-3p olarak belirtilmiştir ve erken MF grubunda, miR-106b'nin ekspresyonu 1,78 kat artmış, miR-148a'nın 1,64 kat miR-338'in 2,63 kat azaldığı rapor edilmiştir (Lindahl vd 2018). Yine Danimarka'da yapılan bir diğer çalışmada RT-PCR ile 13 erken MF, 42 ileri düzey KTHL ve 20 atopik dermatit olgularında parafin blok materyallerinde, miRNA ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda erken MF grubu ileri evre MF grubuyla karşılaştırıldığında miR-31, miR-10a ve miR-302c ekspresyonları azalmış ve miR-93, miR-181a ve miR-223 ekspresyonlarındaki artış anlamlı bulunmuştur. miR-21 ekspresyonunun ise 2 kat artış göstermiş fakat anlamlı bulunamamıştır (Ralfkiaer vd 2014). Bizim alışmamızda benzer şekilde da MF grubunda miR-21 ekspresyonu 6,7 kat artmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer bir şekilde kutanöz T hücreli lenfomada 47 hasta üzerine yapılan bir ekspresyon çalışmasında miR-21'in KTHL'de kontrole göre 9 kat daha fazla miR-21 ekspresyonu olduğunu gösterilmiştir (Lindahl vd 2016) . Bizim alışmamızda miR-223 ekspresyonu ise bu çalışmadan farklı olarak MF grubunda 1,5 kat azalmış olarak tespit edilmiştir fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. McGirt ve çalışma arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada miR-223 ekspresyonunun 28 kişilik MF hasta grubunda azaldığını rapor edilmiştir (McGirt vd 2014).

Sandoval ve arkadaşları tümöral MF evresindeki 21 olguda kanser ilişkili miRNA'lardan miR-142-3p'nin 5,9 kat, miR-146a'nın 5,5 kat, miR-155'in 4,5 kat, miR-21'in 2,6 kat, miR-181a'nın 2,9 kat ve miR-181b'nin 2 kat ekspresyonlarında artış olduğu miR-193b'nin 1,6 kat, miR-10b'nin 1,5 kat, miR-141'in 2,9 kat ve miR-200c'nin 2,5 kat ekspresyonlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca CD30+ cALL hastalarında miR-21 ve miR-142 ekspresyonlarında artış, miR-193b ve miR-195 ekspresyonlarında da azalış olduğunu belirtmişlerdir (Sandoval vd 2015). Papdavid ve ekibi tarafından yapılan bir araştırmada tümöral evredeki 10 MF olgusunda deri biyopsilerinde yapılan mikroarray analizinde 154 miRNA arasından en anlamlı değişimin gözleendiği miRNA'lar ekspresyonlarındaki artışla miR-3177, miR-514b-3p, miR-1267 ve miR-1282, yine ekspresyonlarındaki azalışla miR-34a, miR-29a ve let-7a olarak rapor edilmiştir. Seçilen bu miRNA'ların DIANA-miRPath v2.0 programı ile online yolak analizi de gerçekleştirildiğinde anlamlı değişim gösteren miRNA'ların ilişkili olduğu yolaklar RNA degradasyonu, aktin hücre iskeletinin regölasyonu, hücre döngüsü, mTOR sinyal yolağı,

T hücre sinyal reseptör yolağı, fokal adezyon ve PI3K-Akt yolağı olduğu gözlemlenmiştir. Bu miRNA'ların hedefleri arasında hangi genler olduğu Tarbase programı ile incelenmiş ve en çok miRNA hedef ilişkisi bulunan genlerin BCL7A, CLU, NAV3, IRF4, GCNT1 gibi genler olduğu rapor edilmiştir (Papadavid vd 2016). Bizim çalışmamızda seçilen miRNA'lar Toll-benzeri reseptör yolağıyla ilişkili olan miRNA'lar olup KEGG yolak analizi ve hedef tespiti yapıldığında Toll benzeri reseptör yolağına ek olarak ayrıca bu miRNA'lar, TNF sinyal yolağı, yağ asidi metabolizması, viral karsinogenez, kanser yolakları, TGF-beta, mTOR, NFkB, MAPK ve kanser ilişkili proteoglikanlar gibi hücrel yolaklarla da ilişkili bulunmuştur.

Garaicano ve araştırma grubu tarafından da MF hastalarında genom düzensizliği ile ilgili bir çalışmada miR-17-92 ve miR-155 ekspresyonlarının anormal şekilde değiştiği ve yüksek ekspresyon sergiledikleri ortaya koyulmuştur (Garaicoa vd 2016). Çok yakın bir zamanda gerçekleştirilen çalışmada MF'te miR-106b-5p, miR-148a-3p ve miR-338-3p olmak üzere üç adet miRNA ekspresyonu değişimi araştırılmış ve sonuç olarak ekspresyonlarında anlamlı değişim belirlenmiştir. Bu üç miRNA'nın da kapsamlı çalışmalar ile teyit edilerek prognositik marker olma potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir (Wasik 2018). Diğer bir çalışmada 10 KTHL hastası (7 MF, 3 SS) ve 11 non-malignant kontrol üzerinde karşılaştırmalı olarak plazma örneklerinde miR-155, miR-230 ve miR-205' seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda KTHL hastalarında miR-155'in upregüle, miR-203 ve miR-205'in downregüle olduğunu rapor etmişlerdir (Dusílková vd 2017). Bu miRNA'ların KTHL hastalarında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini belirtmiş olmakla beraber çalışmadaki hasta sayısının azlığı daha detaylı ve daha çok hasta içeren çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini göstermektedir. Moyal ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada miR-155'in MF tümör progresyonunda rol oynuyor olabileceğini rapor etmişlerdir (Lilach Moyal vd 2013).

Kester ve arkadaşları 19 tümöral MF hastası ile 12 benin inflamatuvar dermatoz grubu arasındaki miRNA ekspresyon değişimlerini array yöntemiyle karşılaştırmışlar ve anlamlı değişim bulunan miR-93, miR-155 ve miR-92'nin ekspresyon değişimlerini RT-PCR ile teyit etmişlerdir. miR-93 ekspresyonu hasta grubunda 5,8, miR-155,4 ve miR-92'nin de 3,2 kat artış gösterdiğini bulmuşlardır (van Kester vd 2011). Bizim çalışmamızda da let-7e ekspresyonunun hasta grubunda 9 kat gibi önemli bir azalma olduğu görülmüştür. Mikozis fungoides hastalığında miRNA ekspresyon değişimi üzerine yapılan bir diğer çalışmada Maj ve arkadaşları 23 sağlıklı bireyden kontrol amaçlı ve 18 erken MF ve 25 ileri evre tümöral MF olmak üzere 43 hasta biyopsisinden alınan örneklerde miR-15a, miR-16, miR-155, let-7a ve let-7f ekspresyon değişimini karşılaştırmışlardır. Sadece let-7f ekspresyonunda kontrol grubuna göre artış tespit

etmişlerdir (Maj vd 2012). 2019 yılında yayınlanan, MF alt gruplarından eritrodermik MF (eMF) ve Sezary Sendromu hastalarındaki miRNA ekspresyon karşılaştırması yapılan bir çalışmada, 15 Erken MF, 14 eritrodermik MF ve 11 SS olgusunda panel kullanılarak 383 miRNA içeren profillemeye deneyi gerçekleştirilmiştir. miR-22-3p, miR-199a-3p, miR-199a-5p ve miR-199b5p olmak üzere 4 adet miRNA'nın erken evre MF ile karşılaştırıldığında ekspresyonunun eMF ve SS grubunda anlamlı olarak arttığı, 7 adet miRNA'nın miR-27b-5p, miR-328-3p, miR-342-3p, miR-433-3p, miR-483-3p, miR-484, ve miR-663a'nın ekspresyonlarının ise düştüğünü tespit etmişlerdir (Rittig vd 2019).

Mikozis fungoides hücre hatları ile yapılan ve miRNA ekspresyon değişimlerinin araştırıldığı çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Bizim de MJ hücrelerindeki çalışmamızda da araştırdığımız ve oldukça güçlü ekspresyon artışının olduğunu tespit ettiğimiz miR-155 ekspresyonu ile ilgili olarak yakın zamanda yapılan bir çalışmada MyLa ve MJ MF hücre hatları ile Hut78 SS hücre hatlarında, insan periferik kan lenfositlerinden kontrol amaçlı yapılan primer hücre hattında ve ksenograft hayvan modelinde yaptığı çalışmada *in vitro* ve *in vivo* olarak miR-155'in rolünü araştırmışlardır. MyLA ve MJ hücrelerinde miR-155'in ekspresyonunun yüksek olduğu HuT 78 hücrelerinde ise diğer hücrelere göre daha düşük ekspresyon sergilediği görülmüştür. miR-155'in susturulması ve overekspresyonu ile MF hücrelerinde hücre döngüsü ve apoptotik mekanizmalarda nasıl bir değişim olabileceği de araştırılmış ve miR-155'in inhibisyonunun G₂/M kontrol noktasını aktive ettiği ve antikanser ilaçlara karşı apoptotik cevabı arttırdığını rapor etmişlerdir. Hayvan modeli çalışmasında da miR-155'in susturulmasının tümör dokusunu ve gelişimini azalttığı *in vivo* olarak gösterilmiştir. Böylece miR-155'in MF patogenezinde etkili bir stratejik hedef olabileceği ve hücre sağkalımı ile ilgili temel hücresel mekanizmalarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (L. Moyal vd 2017). miR-223'ün çalışmamızda MJ hücre hattında ekspresyonu artmış olarak tespit edilmiş olmakla birlikte McGrif ve arkadaşlarının HuT-78 ve HH hücre hatlarında CD⁺ T hücreleriyle karşılaştırıldığında daha düşük miR-223 ekspresyonu sergilediklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca miR-223'ün bu hücre hatlarında hücre gelişimini regüle ettiği, klonogenik potansiyeli inhibe ettiği ve E2F1, MEF2C ve TOX gibi proto-onkogenleri hedeflediğini belirtmişlerdir (McGirt vd 2014).

Mikozis fungoide hastalığında miR-214 üzerine doğrudan bir çalışma olmamakla birlikte kutanöz T hücreli lenfoma tiplerinden sezary sendromunda yapılan bir araştırmada miR-214 CD16⁺/CD4⁺ hücreleri ile ilişkili bulunmuştur. miR-214 ekspresyonunun bu hastalıkta önemli derece overekspresyon sergilediği rapor edilmiştir. Ayrıca miR-214'ün sezary sendromunda patogenezinde rol aldığı düşünülen önemli genlerden FCRL3, Tox ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir (Benoit vd 2017). Bizim

çalışmamızda MF hasta grubundaki miR-214 artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. miR-375, miR-200a, miR-224, miR-214, miR-424, let-7e, miR-130a, miR-210 ve miR-204 ile ilgili MF'teki ekspresyon değişimleri de bizim çalışmamızla literatüre eklenmiştir. Çalışmamızda araştırılan mRNA ve miRNA ekspresyon değişimlerinde tanı almış MF hastaları ile kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaya erken MF/MF şüphesi kategorisindeki olgularında oluşturulacağı bir grup ile tanı almış MF grubunun karşılaştırılması daha efektif ve prognostik değeri yüksek bir çalışma olacaktır. Elde ettiğimiz verilerle bundan sonraki çalışma planlarına ve daha ileri araştırmalara kılavuzluk edecektir.

Kodlamayan RNA'ların MF patogenezindeki rolleri ile ilgili çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. miRNA'lara ek olarak uzun kodlamayan RNA'ların (LncRNA) da MF patogenezinde rol alabileceği sorusu sorulmaya başlamıştır. Yapılan bir çalışmada C-C motif kemokin ligand 21'in MF hastalığındaki rolü aydınlatılmaya çalışılmış ve çalışmada uzun kodlamayan RNA'ların MF hücre migrasyonunda rol oynayabilecekleri belirtilmiştir. 5 MF hastası gibi oldukça kısıtlı bir hasta popülasyonunda gerçekleştirilen çalışmada uzun kodlamayan RNA'lardan *MALAT1*, *ANRIL*, *HOTAIR*, *HULC* ve *LUNAR1* ekspresyon değişimlerinin degrüle olduğu belirlenmiştir. Bu LncRNA'lar arasında MALAT 1 ekspresyonunun upregüle olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği tespit edilmiştir. MyLA isimli MF hücre hattında da MALAT1'in hücre migrasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Hong vd 2019). Bu çalışmanın ileri araştırma hedeflerinden birisi de uzun kodlamayan RNA, piwi RNA gibi kodlamayan RNA'ların MF hastalarındaki ekspresyon değişimleri ve bunların hastalığın patogenezinde rol alıp almadıklarını araştırmak olacaktır.

Geçtiğimiz on yıllar boyunca MF hakkındaki bilgimiz önemli ölçüde artmıştır, ancak yine de hastalığın patogenezi ve ilerlemesinde rol oynayan süreçler hakkında çok az şey bilinmektedir. Çalışmalar, miRNA'ların MF patogenezinde belirgin şekilde rol oynuyor olabileceğini göstermektedir; Bununla birlikte, detaylı olarak MF'nin spesifik miRNA ekspresyon profilinin yapılması gerekir. Ayrıca MF'deki miRNA değişikliklerinin değerlendirilmesinin bu lenfomanın tanısında ve erken evre MF ile tümöral evre arasındaki karşılaştırmada tanı açısından da yararlı bir hedef olabileceğini göstermektedir. Literatür verileri ve kendi sonuçlarımız da dahil edildiğinde bu kodlamayan RNA sınıfı olan mikro RNA'ların hem solid tümörlerde hem de hematolojik malignansilerde yeni stratejik terapötik hedef olduğunu ve hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında oldukça önem arz ettiğini ve gelecekte umut verici çalışmalara ışık tutacağını göstermektedir.

Kök hücrelerin T hücrelerine farklılaşması sırasında, transkripsiyonel olmayan gen fragmanları, DNA rekombinaz tarafından katalize edilen bir işlemle tam bir gene yeniden düzenlenir. Yeni gen, T hücreleri farklılaşmaya devam ettikçe antijene spesifik reseptörü eksprese eden transkripsiyonel aktivite kazanır. Buna karşılık, gen yeniden düzenlemesi başarısız olursa, hücreler apoptoza yönlendirilir. Bu işlem, T hücresi reseptörü (TCR) geninin yeniden düzenlenmesi olarak adlandırılır. Poliklonal yeniden düzenleme normal T hücresi gelişimi sırasında olur. Bununla birlikte, tüm hematopoetik ve lenfoid tümör hücreleri, aynı TCR gen yeniden düzenlemesini, yani monoklonal yeniden düzenlemeyi paylaşır (Xu vd 2011). Southern blot ve PCR yöntemleri ile deri dokusunda T hücrelerin klonal gen yeniden düzenlemeleri tespit edilebilir. Eski çalışmalarda Southern blot yöntemi yaygın kullanılırken günümüzde basit, kolay uygulanabilme, kısa sürede daha çok örnek çalışabilme, reaktif kontaminasyon riski olmaması, parafin blok materyallerinde bile yüksek hassasiyetle çalışabilmesi gibi sebeplerle klinik ve deneysel tespitlerde PCR tekniği kullanılmaktadır. T hücreleri THR α , β , δ ve γ gen yeniden düzenlenmesi içermekle birlikte THR γ nispeten basit bir yapı ile tamamen korunduğundan ve en sık klonal değişimin gözlemlenmesi sebebiyle çoğu araştırmacı tarafından lenfoma klonal geninin yeniden düzenlenmesi için bir hedef gen olarak seçilmektedir (Cozzio ve French 2008). Ayrıca Avrupa BIOMED2 programının bir parçası olarak, TCR geni için primerlerin ortaya çıkması, klonal TCR α , β , δ , γ geni yeniden düzenlenmesinin tespit oranını büyük ölçüde arttırmıştır (Sandberg vd 2005, Shin vd 2013). Kutanöz kenfomada THR gen yeniden düzenlenmesi tespiti için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. THR gen yeniden düzenlenmesinin karmaşıklığı ve çeşitliliği ve primer tasarım ve sayılar, numuneler ve PCR ürünlerindeki farklılıklar nedeniyle, bu çalışmaların sonuçları T hücre lenfomaların %50 ila %90'ının THR γ gen yeniden düzenlemesine sahip olduğunu gösterir. MF evrelerine daraltıldığında, tespit oranları yama fazı için% 52 - % 75, plak fazı için% 73 - % 83 ve tümör için% 90 - % 100 oranlarında olduğu rapor edilmiştir (Hodges vd 2003, P. F. Hsiao vd 2007, L Kandolf Sekulović vd 2007, Wood 2001).

Yapılan THR gen yeniden düzenlenmesi çalışmaları MF'nin erken teşhisinde şüpheli MF hastalarında daha kullanışlı ve teşhise yardımcı sonuç vermesi açısından daha önemlidir. Çünkü erken dönem MF, çeşitli klinik belirtilere ve spesifik olmayan patolojik özelliklere sahiptir. MF için önemli bir teşhis yöntemi olarak immünohistokimya, tümör hücrelerinin kökenini belirleyebilir ancak çoğalan hücrelerin klonalitesini belirleyemez. Ayrıca, erken MF'ye sıklıkla reaktif lenfositler eşlik ettiğinden, çoğu vaka karakteristik bir immünofenotip göstermez. Bu durumlar için immünohistokimya sınırlı bir teşhis değerine sahiptir olmak birlikte moleküler tanı gerekli olmaktadır. Genel olarak, gen yeniden

düzenlemesi tümör dönüşümünden önce gerçekleşir. Bir tarafta, klonal olarak çoğalan tümör hücreleri aynı antijen gen yeniden düzenlemesini (monoklonalite) barındırırken, iyi huylu lezyonlardan gelen her T veya B hücresi benzersiz bir gen yeniden düzenlemesini (poliklonalite) taşır. Bu nedenle, teoride, antijen reseptör geninin genetik yeniden düzenleme analizi, çoğalan lenfomayı ve reaktif lezyonları ayırt etmede yardımcı olur. (Xu vd 2011). Atipik kutanöz T lenfosit proliferatif hastalıkların dokularındaki gen düzenlemesini analiz etmek için PCR kullanıldığında, duyarlılık % 83.5 ve özgüllük% 97.7 arasında olduğu rapor edilmiş ve MF şüpheli erken vakalarda TCR γ gen yeniden düzenlemesinin pozitif oranının % 40 ile% 71 arasında olduğu bildirilmiştir ve bu durumun erken teşhis için yeterli bir oran olduğu belirtilmiştir (P. F. Hsiao vd 2007, L Kandolf Sekulović vd 2007, Renata Ponti vd 2008). Xu ve arkadaşları 6 MF (%32) ve MF şüphesi olan olguda 13 MF (%68) şüphesi bulunan 19 olguda THR gama ve beta yeniden düzenlenmesi karşılaştırmış ve gruplarda daha fazla THR gama gen yeniden düzenlenmesi oranı tespit etmişlerdir (Xu vd 2011). Wood ve arkadaşları yaptıkları çok kapsamlı bir çalışmada geniş hasta popülasyonu içeren bir çalışmada 68 MF vakasının %90'unda, erken MF vakalarının %75'inde THR gama gen yeniden düzenlenmesi tespit etmişlerdir. Klonal patern ile klinik progresyon arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmediğini belirtmişlerdir (Wood vd 1994). Bizim çalışmamızda MF teşhisi almış olan hastaların THR γ gen yeniden düzenlemeleri değerlendirilmiştir. TCRA ve TCRB ortak değerlendirildiğinde 27 olgunun 15'inde monoklonal ve biklonal olarak değerlendirildi. Diğer 12 örnek poliklonal olarak değerlendirildi. MF olgularının 12'sinde poliklonal durum tespiti gama reseptörü için yapılmış olup bu örneklerden alfa ve beta klonal değişim gerçekleşmiş olabilir. Çalışmamızda yaş ve cinsiyete bağlı olarak klonal farklılık arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Çalışmamızda MF şüphesi ile örnek alınan grup olmadığı için erken evre ve tanı koyulmuş MF hasta grubu arasında bir karşılaştırılma yapılamamış olunmakla birlikte bundan sonra gerçekleştirilmesi planlanan çalışmalara elde ettiğimiz veriler ışık tutacaktır.

TLR'ler bakteri ve virüs gibi çevreden gelen mikrobiyal hakarete karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin uyarılmasında rol oynayan bir protein ailesi olarak gösterilmiştir. Günümüzde doğuştan gelen bağışıklık ile kanser arasındaki çalışmalar araştırmacılardan büyük ilgi görüyor ve bu çalışmalar aslında kansere karşı terapötik stratejilerin geliştirilmesi için kritik bilgiler sunuyor. Son araştırmalar ve patentler, TLR ekspresyon profilinin spesifik kanserin teşhisinde kılavuzlardan biri olabileceğini göstermiştir. TLR agonisti veya antagonisti ajanlar, tümörden izole edilen antijen ile kombinasyon halinde kullanarak kansere karşı spesifik olarak doğuştan gelen bağışıklığı uymayı öngörüyorlar. Her ne kadar TLR, konakçı doğal bağışıklık sistemine aracılık

edebilse de birçok tümör vakasında TLR'lerin aşırı ekspresyonu paradoksal olarak bulunmuştur. Ayrıca, TLR aracılı sinyalin tümör gelişimini arttırdığı ve bazı kanser modellerinde tümör hücrelerinin konakçı immün sisteminden kaçtığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar ve gözlemler, yüksek protein seviyelerinin neden olduğu biyolojik sonuçların hem hücre içi hem de hücreler arası ortam tarafından belirlendiğini kuvvetle önerilmektedir. TLR'lerin incelenmesi hala erken aşamadır, bu nedenle TLR yolağının kanser türlerindeki rolünü anlamak için her TLR'nin daha ayrıntılı işlevini tespit ederek araştırmamız gerekir (So ve Ouchi 2010). Böylece MF gibi kutanöz T hücreli lenfoma türlerinin de dahil olduğu dermatolojik hastalıklar başta olmak üzere tüm kanser ve diğer hastalıklarda TLR'nin patogenezdaki rolünü anlamak ve tedaviye katkı sunabilmesi için detaylı temel moleküler çalışmalar ve klinik araştırmalar yapılmalıdır.



6. SONUÇLAR

Toll benzeri reseptörler ve bu yolda görev alan genlerin ve miRNA'ların MF hasta grubunda ekspresyon değişimlerinin kontrole göre nasıl değiştiği ve bu hastalıkla ilişkili durumları araştırılmaya çalışılmıştır. Tanı almış MF hasta grubu ve kontrol grubundan alınan arşiv materyallerinden alınan kesitlerden yapılan RNA izolasyonu ve takiben RT-PCR ile tüm 10 Toll benzeri reseptörün ve bu TLR yolağında görev alan diğer 15 genin mRNA seviyelerindeki değişimler karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda,

- ✓ Bu çalışma ile tüm TLR'leri ve yolda görevli genler ve ilişkili miRNA'ların MF'teki ekspresyon durumları toplu olarak ilk defa ortaya koyulmuştur.
- ✓ MF hasta grubunda TLR reseptörlerinden *TLR-1*, *TLR-3*, *TLR-4*, *TLR-8* ve *TLR-9* ekspresyonlarındaki artışlar anlamlı bulunmuştur.
- ✓ MJ hücre hattında kontrole göre *TLR-1*, *TLR-4* ve *TLR-8* ekspresyonlarının artışı anlamlı bulunmuştur.
- ✓ MF hasta grubunda TLR reseptör sinyal iletim yolağında görevli olan ve yine downstream hedef genleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *IRF-7*, *TRAF-3*, *TRIF*, *MEK1*, *MEK2*, *Elk1* ve *NFkB* ekspresyonlarındaki artış anlamlı bulunmuştur.
- ✓ MJ hücre hattında TLR reseptör sinyal iletim yolağında görevli olan ve yine downstream hedef genleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *IRAK 4*, *IRF-7*, *TRAF3*, *TAB2*, *MEK1*, *MEK2*, *ERK1*, *ERK2*, *Elk1* ve *NFkB* ekspresyon artışı ve *TRIF* mRNA ekspresyon azalışı anlamlı bulunmuştur.
- ✓ Hem hasta grubu hem de hücre hattında elde edilen sonuçlar ortak değerlendirildiğinde *TLR-1*, *TLR-4* ve *TLR-8* reseptörleri ile *IRF-7*, *TRAF3*, *MEK1*, *MEK2*, *Elk1* ve *NFkB* ekspresyon artışlarının MF hastalığında rol oynuyor olabileceği gösterilmiştir.
- ✓ MF hasta grubunda miR-21, miR-155, miR-424, ve miR-375 ekspresyonlarının artışı ve miR-210, miR-130a, miR-224 ve let-7e ekspresyon azalışları anlamlı bulunmuştur.
- ✓ MJ hücre hattında miR-21, miR-155, miR-214, miR-223 ve miR-224 ekspresyon artışları ve miR-146a, miR-130a, miR-200a, miR-210 ve let-7e ekspresyon azalışları anlamlı bulunmuştur.
- ✓ Hem hasta grubu hem de hücre hattında elde edilen sonuçlar ortak değerlendirildiğinde, miR-21 ve miR-155 ekspresyon artışları ve miR-130a, miR-210 ve let-7e ekspresyon azalışları anlamlı bulunmuştur. Bu değişimler MF

patogenezini anlamamızda literatüre ve bu alanda yapılan çalışmalara katkı sağlayacaktır.

- ✓ Pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerinin artışının olduğu MF hastalığında *NFkB* ve *IRF* transkripsiyonel faktörlerinin artışı teyit edilmiş ve transkripsiyonel faktörlerin artışının TLR yolağındaki genlerin aktivasyonlarına bağlı olabileceği görülmüştür.
- ✓ MF hastalığı T hücre reseptörü gen yeniden düzenlenmesinin ve klonal değişimin olduğu bir hastalık olup bizim çalışmamızda da T hücre reseptörü gama açısından monoklonal, biallelik ve poliklonalite tespit edilmiştir.
- ✓ T hücre reseptörü gama klonalitesi ile yaş ve cinsiyet arasında bir anlamlılık tespit edilmemiştir.

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler MF patogenezinde TLR yolağındaki genlerin ekspresyon değişimleri ve TLR sinyal yolağının rolü değerlendirilmiştir. MF grubunda TLR yolağında görevli reseptörlerin ve ilişkili genlerin hem hücre hattı hem de hastalar üzerinde yapılan çalışmada anlamlı değişim gösterdiği görülmüştür. Erken evre MF grubu örnekleri ile yapılacak çalışmada da elde edilen bu veriler karşılaştırıldığında hastalığın erken evrelerinde bu yolda görevli genlerin potansiyel prognostik belirteç olabilme durumları ortaya koyulabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Akkaya VB. Mikozis fungoides etyopatogenezi. *T Klin J Dermatol*.2004;14:24-7.
- Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, Coyle SM, Corbett SA, Calvano SE, Lowry SF. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186 (10): 1522–5.
- Ajibade AA, Wang HY, Wang R-F. Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling. *Trends Immunol* 2013; 34 (7): 307–16.
- Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15 (1): 5–11.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(7):499-511.
- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297
- Bastidas Torres AN, Cats D, Mei H, Szuhai K, Willemze R, Vermeer MH, Tensen CP. Genomic analysis reveals recurrent deletion of JAK-STAT signaling inhibitors HNRNPK and SOCS1 in mycosis fungoides. *Genes Chromosom Cancer* 2018; 57 (12): 653–664.
- Baykal C. Derinin lenfoproliferatif hastalıkları. *Dermatoloji Atlası* (2. baskı). Argos, İstanbul 2004, Sy. 630-53.
- Bayraktar R, Bertilaccio MTS, Calin GA. The Interaction Between Two Worlds: MicroRNAs and Toll-Like Receptors. *Front Immunol* 2019; 14;10:1053
- Benoit BM, Jariwala N, O'Connor G, Oetjen LK, Whelan TM, Werth A, Troxel AB, Sicard H, Zhu L, Miller C, Takeshita J, McVicar DW, Kim BS, Rook AH, Wysocka M. CD164 identifies CD4+ T cells highly expressing genes associated with malignancy in Sézary syndrome: the Sézary signature genes, FCRL3, Tox, and miR-214. *Arch Dermatol Res* 2017; 309 (1): 11–19.
- Bernal A, Proft T, Fraser JD, Posnett DN. Superantigens in human disease. *J Clin Immunol* 1999; 19 (3): 149–57.
- Bertness V, Kirsch I, Hollis G, Johnson B, Bunn PA. T-cell receptor gene rearrangements as clinical markers of human T-cell lymphomas. *N Engl J Med* 1985; 313 (9): 534–8.
- Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure* 2011; 19 (4): 447–59.
- Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood* 2009; 113 (21): 5064–5073.
- Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54:1182–1193
- Chen C-Z. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; 353 (17): 1768–71.
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. microRNAs are ligands of Toll-like receptors. *RNA* 2013; 19:737–739

- Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK. *Immunol Rev* 2012; 246 (1): 95–106.
- Choi J, Goh G, Walradt T, Hong BS, Bunick CG, Chen K, Bjornson RD, Maman Y, Wang T, Tordoff J, Carlson K, Overton JD, Liu KJ, Lewis JM, Devine L, Barbarotta L, Foss FM, Subtil A, Vonderheid EC, Edelson RL, Schatz DG, Boggon TJ, Girardi M, Lifton RP. Genomic landscape of cutaneous T cell lymphoma. *Nat Genet* 2015; 47 (9): 1011–9.
- Cozzio A, French LE. T-cell clonality assays: how do they compare? *J Invest Dermatol* 2008; 128 (4): 771–3.
- Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of Cutaneous T-Cell Lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol* 2007; 143 (7): 854–9.
- Çakıroğlu E ve Anadolu R. Dermatolojide T hücre Reseptör Gen Rearranjmanı. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 1999; 52(2):111-115
- da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, Martinez-Escala E, Guitart J, Tensen CP, Vermeer MH, Rabadan R, Ferrando A, Palomero T. The mutational landscape of cutaneous T cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Genet* 2015; 47 (12): 1465–70.
- Denis D, Beneton N, Laribi K, Maillard H. Management of mycosis fungoides-type cutaneous T-cell lymphoma (MF-CTCL): focus on chlormethine gel. *Cancer Manag Res* 2019; Volume 11 : 2241–2251.
- Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol* 2000; 143 (6): 1205–10.
- Dereure Olivier, Levi E, Vonderheid EC, Kadin ME. Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: A possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol* 2002; 118 (6): 949–956.
- Do JE, Kwon SY, Park S, Lee E-S. Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behcet's disease. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47 (6): 840–8.
- Dongen JJM Van, Langerak AW, Bru M, van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JHJM, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2003; 17(12):2257-317.
- Dosaka N, Tanaka T, Fujita M, Miyachi Y, Horio T, Imamura S. Southern blot analysis of clonal rearrangements of T-cell receptor gene in plaque lesion of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol* 1989; 93 (5): 626–9.
- Dreno B, Celerier P, Fleischmann M, Bureau B, Litoux P. Presence of Epstein-Barr virus in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Acta Derm Venereol* 1994; 74 (5): 355–7.
- Dulmage BO, Geskin LJ. Lessons learned from gene expression profiling of cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 2013; 169 (6): 1188–97.

- Dummer R, Willers J, Kamarashev J, Urosevic M, Döbbeling U, Burg G. Pathogenesis of cutaneous lymphomas. **Semin Cutan Med Surg** 2000; 19 (2): 78–86.
- Dusílková N, Bašová P, Polívka J, Kodet O, Kulvait V, Pešta M, Trněný M, Stopka T. Plasma miR-155, mir-203, and miR-205 are biomarkers for monitoring of primary cutaneous T-cell lymphomas. **Int J Mol Sci** 2017; 18 (10).
- Duvic M. Choosing a systemic treatment for advanced stage cutaneous T-cell lymphoma: Mycosis fungoides and Sé zary syndrome. **Hematology** 2015; 529-44
- El Tawdy AM, Amin IM, Abdel Hay RM, Hassan AS, Gad ZS, Rashed LA. Toll-like receptor (TLR)7 expression in mycosis fungoides and psoriasis: a case-control study. **Clin Exp Dermatol** 2017; 42 (2): 172–177.
- Erickson B, Sperber K, Frishman WH. Toll-like receptors: New therapeutic targets for the treatment of atherosclerosis, acute coronary syndromes, and myocardial failure. **Cardiol Rev** 2008; 16(6):273-9
- Ferahbas A. Mikozis Fungoides, klinik varyantları ve subtipleri. **Turkiye Klinikleri J Dermatol** 2007;17:242-251
- Florell SR, Cessna M, Lundell RB, Boucher KM, Bowen GM, Harris RM, Petersen MJ, Zone JJ, Tripp S, Perkins SL. Usefulness (or lack thereof) of immunophenotyping in atypical cutaneous T-cell infiltrates. **Am J Clin Pathol** 2006; 125 (5): 727–36.
- Fung MA, Murphy MJ, Hoss DM, Grant-Kels JM. Practical evaluation and management of cutaneous lymphoma. **J Am Acad Dermatol** 2002; 46 (3): 325–57; quiz, 358–60.
- Galper SL, Smith BD, Wilson LD. Diagnosis and management of mycosis fungoides. **Oncology (Williston Park)** 2010; 24(6):491-501.
- Garaicoa FH, Roisman A, Arias M, Trila C, Fridmanis M, Abeldaño A, Vanzulli S, Narbaitz M, Slavutsky I. Genomic imbalances and microRNA transcriptional profiles in patients with mycosis fungoides. **Tumor Biol** 2016; 37 (10): 13637–13647.
- Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The Pathogenesis of Mycosis Fungoides. **N Engl J Med** 2004; 350 (19): 1978–1988.
- Gomolka M, Epplen C, Buitkamp J, Epplen JT. Novel members and germline polymorphisms in the human T-cell receptor Vb6 family. **Immunogenetics** 1993; 37 (4): 257–65.
- Groenen PJTA, van Raaij A, van Altena MC, Rombout PM, van Krieken JMH. A practical approach to diagnostic Ig/TCR clonality evaluation in clinical pathology. **J Hematop** 2012;(2012) 5:17–25
- Guitart J, Kennedy J, Ronan S, Chmiel JS, Hsiegh YC, Variakojis D. Histologic criteria for the diagnosis of mycosis fungoides: Proposal for a grading system to standardize pathology reporting. **J Cutan Pathol** 2001; 28(4):174-83.
- Gulwani-Akolkar B, Shi B, Akolkar PN, Ito K, Bias WB, Silver J. Do HLA genes play a prominent role in determining T cell receptor V alpha segment usage in humans? **J Immunol** 1995; 154(8):3843-51.
- Gündoğdu R ve Çelik V. RNA İnterferans (RNAi). **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi** 2009;25: (1-2) 34 – 47.
- Gürel G, Sabah-Özcan S. Evaluation of Toll-like receptor expression profile in patients with psoriasis vulgaris. **Gene** 2019; 702 : 166–170.

- Guven Maiorov E, Keskin O, Gursoy A, Nussinov R. The structural network of inflammation and cancer: Merits and challenges. **Semin Cancer Biol** 2013; 23(4):243-51
- Güven B ve Can M. Çeşitli Hastalıklarda Toll Benzeri Reseptörlerin Rolü. **Sakarya Medikal Journal** 2012;2(1):1-10
- Hagedorn M, Kiefer G. DNA content of mycosis fungoides cells. **Arch dermatological Res = Arch fur dermatologische Forsch** 1977; 258 (2): 127–34.
- Hitit M, Kurar E ve Güzeloğlu A. MikroRNA Biyogenezi. **Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.** 2015; 10(3): 211-218
- Hodak E, David M, Maron L, Aviram A, Kaganovsky E, Feinmesser M. CD4/CD8 double-negative epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: an immunohistochemical variant of mycosis fungoides. **J Am Acad Dermatol** 2006; 55 (2): 276–84.
- Hodak E, Klein T, Gabay B, Ben-Amitai D, Bergman R, Gdalevich M, Feinmesser M, Maron L, David M. Familial mycosis fungoides: Report of 6 kindreds and a study of the HLA system. **J Am Acad Dermatol** 2005; 52 (3): 393–402.
- Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. **J Clin Pathol** 2003; 56 (1): 1–11.
- Hong CH, Lin SH, Lee CH. CCL21 Induces mTOR-dependent MALAT1 Expression, Leading to Cell Migration in Cutaneous T-Cell Lymphoma. **In Vivo (Brooklyn)** 2019; 33 (3): 793–800.
- Hsiao P-F, Hsiao C-H, Lin Y-C, Tseng M-P, Tsai T-F, Jee S-H. Histopathologic-molecular correlation in early mycosis fungoides using T-cell receptor gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction with laser capture microdissection. **J Formos Med Assoc** 2007; 106 (4): 265–72.
- Hsiao PF, Hsiao CH, Lin YC, Tseng MP, Tsai TF, Jee SH. Histopathologic-molecular correlation in early mycosis fungoides using t-cell receptor γ gene rearrangement by polymerase chain reaction with laser capture microdissection. **J Formos Med Assoc** 2007; 106 (4): 265–272.
- Hu SC-S, Lin C-L, Hong C-H, Yu H-S, Chen G-S, Lee C-H. CCR7 expression correlates with subcutaneous involvement in mycosis fungoides skin lesions and promotes migration of mycosis fungoides cells (MyLa) through mTOR activation. **J Dermatol Sci** 2014; 74 (1): 31–8.
- Iyer A, Hennessey D, O'Keefe S, Patterson J, Wang W, Salopek T, Wong GK-S, Gniadecki R. Clonotypic heterogeneity in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides) revealed by comprehensive whole-exome sequencing. **Blood Adv** 2019;3 (7): 1175-1184
- İnci A ve Bişkin Z. Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Rollerini. **Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg** 2007; 4(2)121-128s
- Izban KF, Ergin M, Qin JZ, Martinez RL, Pooley RJ JR, Saeed S, Alkan S. Constitutive expression of NF-kappa B is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis. **Hum Pathol** 2000; 31 (12): 1482–90.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, vd. T-cell receptor gene rearrangement. Immunobiology: The immune system in health and disease: **Garland Science**, New York, 2001, s 752

- Jarrousse V, Quereux G, Marques-Briand S, Knol AC, Khammari A, Dreno B. Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome). *Eur J Dermatol* 2006; 16(6):636-41.
- Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, Dreno B. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol* 2005; 153 (6): 1105–1113.
- Kado JA, Shango M, Mehregan C, Mehregan DR. Mapping Toll-like receptor activity in different stages of cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol* 2012; 34 (7): 691–8.
- Kandolf Sekulović L, Cikota B, Stojadinović O, Basanović J, Skiljević D, Medenica L, Pavlović M, Magić Z. TCRgamma gene rearrangement analysis in skin samples and peripheral blood of mycosis fungoides patients. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Adriat* 2007; 16 (4): 149–55.
- Kandolf Sekulović Lidija, Cikota B, Jović M, Škiljević D, Stojadinović O, Medenica L, Magić Z. The role of apoptosis and cell-proliferation regulating genes in mycosis fungoides. *J Dermatol Sci* 2009; 55 (1): 53–56.
- Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007; 13 (5): 552–9.
- Karaca N ve Öztürk G. Dermatolojide Toll Benzeri Reseptörler. *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2012;22(1):8-18.
- Karagianni F, Kolialexi A, Papadavid E. JAK/STAT Signaling Pathway and Inhibitors in Inflammatory and Neoplastic Skin Diseases. *Ann Hematol Oncol*. 2019; 6(4): 1245.
- Karenko L, Hahtola S, Päivinen S, Karhu R, Syrjä S, Kähkönen M, Nedoszytko B, Kytölä S, Zhou Y, Blazevic V, Pesonen M, Nevala H, Nupponen N, Sihto H, Krebs I, Poustka A, Roszkiewicz J, Saksela K, Peterson P, Visakorpi T, Ranki A. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas Show a Deletion or Translocation Affecting *NAV3*, the Human *UNC-53* Homologue. *Cancer Res* 2005; 65 (18): 8101–8110.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11(5):373-384
- Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol* 2014; 5 :461.
- Kaye FJ, Bunn PA, Steinberg SM, Stocker JL, Ihde DC, Fischmann AB, Glatstein EJ, Schechter GP, Phelps RM, Foss FM, Parlette HL, Anderson MJ, Sausville EA. A Randomized Trial Comparing Combination Electron-Beam Radiation and Chemotherapy with Topical Therapy in the Initial Treatment of Mycosis Fungoides. *N Engl J Med* 1989;
- Kazakov D, Burg G, Kempf W. Clinicopathological spectrum of mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2004; 18 (4): 397–415.
- Keehn CA, Belongie IP, Shistik G, Fenske NA, Glass LF. The Diagnosis, Staging, and Treatment Options for Mycosis Fungoides. *Cancer Control* 2007; 14 (2): 102–111.
- Kim-James HY, Heffernan MP. The diagnosis, evaluation, and treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Curr Probl Dermatol* 2001; 13 (6): 301–340.
- Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest* 2005; 115 (4): 798–812.

- Kim SK, Park S, Lee ES. Toll-Like receptors and antimicrobial peptides expressions of psoriasis: Correlation with serum vitamin D level. **J Korean Med Sci** 2010; 25 (10): 1506–1512.
- Kim YH, Girardi M, Duvic M, Kuzel T, Link BK, Pinter-Brown L, Rook AH. Phase I trial of a Toll-like receptor 9 agonist, PF-3512676 (CPG 7909), in patients with treatment-refractory, cutaneous T-cell lymphoma. **J Am Acad Dermatol** 2010; 63 (6): 975–83.
- Kim YH, Gratzinger D, Harrison C, Brody JD, Czerwinski DK, Ai WZ, Morales A, Abdulla F, Xing L, Navi D, Tibshirani RJ, Advani RH, Lingala B, Shah S, Hoppe RT, Levy R. In situ vaccination against mycosis fungoides by intratumoral injection of a TLR9 agonist combined with radiation: A phase 1/2 study. **Blood** 2012; 119 (2): 355–363.
- Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe RT. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sezary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. **Arch Dermatol** 2003; 139 (7): 857–66.
- Knol AC, Ehst BD, Domp Martin A, Quéreux G, Nguyen JM, Comoz F, Renaut JJ, Khammari A, Vonderheid EC, Dréno B. Toll-like receptor 2, 4, 7 and 9 expression in primary cutaneous CD30+ T-cell lymphoma. **Br J Dermatol** 2009; 161 (6): 1414–6.
- Konat VG. Signaling by Toll-like Receptors. **Methods In Signal Transduction Series**, New York, 2008, s. 222.
- Kotz EA, Anderson D, Thiers BH. Cutaneous T-cell lymphoma. **J Eur Acad Dermatol Venereol** 2003; 17 (2): 131–7.
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, Müller I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect Immun** 2004; 72 (4): 1920–8.
- Kundakçı A ve Pirat A. Toll Benzeri Reseptörler. **Türk Yoğun Bakım Dergisi** 2012;10;63-73
- Küçükoğlu R. *Derinin T Hücreli Lenfomaları: Tanı ve Sınıflama*. **Türkderm**;40:1-3
- Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, Boone E, Carter GI, Catherwood M, Davi F, Delfau-Larue M-H, Diss T, Evans PAS, Gameiro P, Garcia Sanz R, Gonzalez D, Grand D, Håkansson A, Hummel M, Liu H, Lombardia L, Macintyre EA, Milner BJ, Montes-Moreno S, Schuurin E, Spaargaren M, Hodges E, van Dongen JJM. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. **Leukemia** 2012; 26 (10): 2159–71.
- Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, Schuurin E, Al Saati T, van Dongen JJM, van Krieken JHJM. Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. **Leukemia** 2007; 21 (2): 222–9.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell** 1996;20;86(6):973-83
- Li JY, Horwitz S, Moskowitz A, Myskowski PL, Pulitzer M, Querfeld C. Management of cutaneous T cell lymphoma: New and emerging targets and treatment options. **Cancer Manag Res** 2012; 4(1):75-89

- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005; 5 (6): 446–58.
- Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 2010; 465(7300):885-90
- Lindahl LM, Besenbacher S, Rittig AH, Celis P, Willerslev-Olsen A, Gjerdrum LMR, Krejsgaard T, Johansen C, Litman T, Woetmann A, Odum N, Iversen L. Prognostic miRNA classifier in early-stage mycosis fungoides: development and validation in a Danish nationwide study. *Blood* 2018; 131 (7): 759–770.
- Lindahl LM, Fredholm S, Joseph C, Nielsen BS, Jønson L, Willerslev-Olsen A, Gluud M, Blümel E, Petersen DL, Sibbesen N, Hu T, Nastasi C, Krejsgaard T, Jæhger D, Persson JL, Mongan N, Wasik MA, Litvinov I V, Sasseville D, Koralov SB, Bonefeld CM, Geisler C, Woetmann A, Ralfkiaer E, Iversen L, Odum N. STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget* 2016; 7 (29): 45730–45744.
- Litvinov I V, Netchiporouk E, Cordeiro B, Dore MA, Moreau L, Pehr K, Gilbert M, Zhou Y, Sasseville D, Kupper TS. The use of transcriptional profiling to improve personalized diagnosis and management of Cutaneous T-cell Lymphoma (CTCL). *Clin Cancer Res* 2015; 21 (12): 2820–2829.
- Mahe E, Pugh T, Kamel-Reid S. T cell clonality assessment: past, present and future. *J Clin Pathol* 2018; 71 (3): 195–200.
- Maj J, Jankowska-Konsur A, Sadakierska-Chudy A, Noga L, Reich A. Altered microRNA expression in mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2012; 166 (2): 331–6.
- Mao X, Orchard G, Lillington DM, Child FJ, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. BCL2 and JUNB abnormalities in primary cutaneous lymphomas. *Br J Dermatol* 2004; 151 (3): 546–556.
- Marks E, Wang Y, Shi Y, Susa J, Jacobson M, Goldstein DY. Specific tcr gene rearrangements in mycosis fungoides: does advanced clinical stage show a preference? *J Clin Pathol* 2018; 71:1072-1077.
- Matthews C, Catherwood MA, Morris TCM, Alexander HD. Routine analysis of IgVH mutational status in CLL patients using BIOMED-2 standardized primers and protocols. *Leuk Lymphoma* 2004; 45(9):1899-904.
- McFarlane V, Friedmann PS, Illidge TM. What's new in the management of cutaneous T-cell lymphoma? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005; 17 (3): 174–84.
- McGirt LY, Adams CM, Baerenwald DA, Zwerner JP, Zic JA, Eischen CM. miR-223 regulates cell growth and targets proto-oncogenes in mycosis fungoides/cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2014; 134 (4): 1101–1107.
- McGirt LY, Jia P, Baerenwald DA, Duszynski RJ, Dahlman KB, Zic JA, Zwerner JP, Hucks D, Dave U, Zhao Z, Eischen CM. Whole-genome sequencing reveals oncogenic mutations in mycosis fungoides. *Blood* 2015; 126 (4): 508–19.
- Miller LS, Sørensen OE, Liu PT, Jalian HR, Eshtiaghpour D, Behmanesh BE, Chung W, Starner TD, Kim J, Sieling PA, Ganz T, Modlin RL. TGF- α Regulates TLR Expression and Function on Epidermal Keratinocytes. *J Immunol* 2005; 174 (10): 6137–6143.
- Morgan SM, Hodges E, Mitchell TJ, Harris S, Whittaker SJ, Smith JL. Molecular analysis of T-cell receptor β genes in cutaneous T-cell lymphoma reveals J β 1 bias. *J Invest*

Dermatol 2006; 126(8):1893-9

- Morris SL. Skin Lymphoma. *Clin Oncol* 2012; 24 (5): 371–385.
- Moyal L, Yehezkel S, Gorovitz B, Keren A, Gilhar A, Lubin I, Sherman S, Hodak E. Oncogenic role of microRNA-155 in mycosis fungoides: an in vitro and xenograft mouse model study. *Br J Dermatol* 2017; 177 (3): 791–800.
- Moyal Lilach, Barzilai A, Gorovitz B, Hirshberg A, Amariglio N, Jacob-Hirsch J, Maron L, Feinmesser M, Hodak E. miR-155 is involved in tumor progression of mycosis fungoides. *Exp Dermatol* 2013; 22 (6): 431–3.
- Naji AA, Waiz MM, Sharquie KE. Mycosis fungoides in identical twins. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44 (3): 532–533.
- Nashan D, Faulhaber D, Ständer S, Luger TA, Stadler R. Mycosis fungoides: a dermatological masquerader. *Br J Dermatol* 2007; 156 (1): 1–10.
- Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martínez P, García C, Gómez E, Rodríguez JL, García D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P. p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol* 2000; 156 (5): 1565–72.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9:402
- O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10 (2): 111–22.
- O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: The fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(3):163-75.
- O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7 (5): 353–64.
- Oka T, Miyagaki T. Novel and Future Therapeutic Drugs for Advanced Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Front Med* 2019; 29;6:116
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276 (13): 10229–33.
- Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg S, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo M-G, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S, ISCL/EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007; 110 (6): 1713–22.
- Onsun N. Erken Evre Mikozis Fungoides Tanısında Algoritmik Yaklaşım. *Türkderm* 2007;41:110-1
- Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschuere IC, Arts P, Garritsen A, Van Eenennaam H, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, Van Der Meer JWM, Netea MG, Joosten LAB. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111 (42): E4478–E4484.
- Papadavid E, Braoudaki M, Bourdakou M, Lykoudi A, Nikolaou V, Tounta G, Ekonomidi A, Athanasiadis E, Spyrou G, Antoniou C, Kitsiou-Tzeli S, Rigopoulos D, Kolialexi

- A. Aberrant microRNA expression in tumor mycosis fungoides. *Tumor Biol* 2016; 37 (11): 14667–14675.
- Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, Wang DY, Li Y, Wang HY, Wang R-F. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 2005; 309 (5739): 1380–4.
- Peterson E, Weed J, Lo Sicco K, Latkowski J-A. Cutaneous T Cell Lymphoma: A Difficult Diagnosis Demystified. *Dermatol Clin* 2019; 37 (4): 455–469.
- Petry V, Gaspari AA. Toll-like receptors and dermatology. *Int J Dermatol* 2009; 48, 558–570
- Piliotis DE, Imrie K, Shear N, Walsh S, Cheung M. Primary Skin Lymphomas. *Odette Cancer Cent Treat Protoc* 2007;1–19.
- Ponti R, Quaglino P, Novelli M, Fierro MT, Comessatti A, Peroni A, Bonello L, Bernengo MG. T-cell receptor gamma gene rearrangement by multiplex polymerase chain reaction/heteroduplex analysis in patients with cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides/Sézary syndrome) and benign inflammatory disease: correlation with clinical, histological and immunophenotypical findings. *Br J Dermatol* 2005; 153 (3): 565–73.
- Ponti Renata, Fierro MT, Quaglino P, Lisa B, Paola F di C, Michela O, Paolo F, Comessatti A, Novelli M, Bernengo MG. TCRgamma-chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan: diagnostic accuracy improvement and clonal heterogeneity analysis in multiple cutaneous T-cell lymphoma samples. *J Invest Dermatol* 2008; 128 (4): 1030–8.
- Qiu B, Wang P, Gao H, Shang Y, Xu L. T-cell receptor gene rearrangement analysis in the primary cutaneous T-cell lymphoma. *Chinese J Cancer Res* 1997; 9 (3): 207–212.
- Querfeld C, Zain J, Rosen ST. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas: Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *Cancer Treat Res* içinde 2019; (C. 176, ss. 225–248).
- Ralfkiaer U, Hagedorn PH, Bangsgaard N, Løvendorf MB, Ahler CB, Svensson L, Kopp KL, Vennegaard MT, Lauenborg B, Zibert JR, Krejsgaard T, Bonefeld CM, Søkilde R, Gjerdrum LM, Labuda T, Mathiesen A-M, Grønbæk K, Wasik MA, Sokolowska-Wojdylo M, Queille-Roussel C, Gniadecki R, Ralfkiaer E, Geisler C, Litman T, Woetmann A, Glue C, Røpke MA, Skov L, Odum N. Diagnostic microRNA profiling in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2011; 118 (22): 5891–900.
- Ralfkiaer U, Lindahl LM, Lindal L, Litman T, Gjerdrum L-M, Ahler CB, Gniadecki R, Marstrand T, Fredholm S, Iversen L, Wasik MA, Bonefeld CM, Geisler C, Krejsgaard T, Glue C, Røpke MA, Woetmann A, Skov L, Grønbæk K, Odum N. MicroRNA expression in early mycosis fungoides is distinctly different from atopic dermatitis and advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Anticancer Res* 2014; 34 (12): 7207–17.
- Rittig A, Lindahl L, Johansen C, Celis P, Ødum N, Iversen L, Litman T. MicroRNA Expression Profile Differs Between Erythrodermic Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Acta Derm Venereol* 2019; (Baskıda)
- Sandberg Y, van Gastel-Mol EJ, Verhaaf B, Lam KH, van Dongen JJM, Langerak AW. BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace Southern blot analysis in routine clonality diagnostics. *J Mol Diagn* 2005; 7 (4): 495–503.

- Sandoval J, Díaz-Lagares A, Salgado R, Servitje O, Climent F, Ortiz-Romero PL, Pérez-Ferriols A, Garcia-Muret MP, Estrach T, Garcia M, Nonell L, Esteller M, Pujol RM, Espinet B, Gallardo F. MicroRNA expression profiling and DNA methylation signature for deregulated microRNA in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 2015; 135 (4): 1128–1137.
- Saydam F, Değirmenci Ş, Güneş HV. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Derg / Dicle Med J* 2011; 38 (1), 113-120
- Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Calonje E, Photiou A, Ferreira S, Orchard G, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Frequent Abnormalities of the P15 and P16 Genes in Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *J Invest Dermatol* 2002; 118 (3): 493–499.
- Schmidt AN, Robbins JB, Greer JP, Zic JA. Conjugal transformed mycosis fungoides: The unknown role of viral infection and environmental exposures in the development of cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54 (5): S202–S205.
- Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, Jackson AL. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2018; 183 (3): 428–444.
- Shapiro PE, Warburton D, Berger CL, Edelson RL. Clonal chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 28 (2): 267–76.
- Shin S, Kim HA, Park J, Kim M, Lim J, Kim Y, Han K, Lee SA, Cho SG. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangement in the bone marrow of lymphoid neoplasia using BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction. *Int J Med Sci* 2013; 10 (11): 1510–1517.
- Sibbesen NA, Kopp KL, Litvinov I V, Jønson L, Willerslev-Olsen A, Fredholm S, Petersen DL, Nastasi C, Krejsgaard T, Lindahl LM, Gniadecki R, Mongan NP, Sasseville D, Wasik MA, Iversen L, Bonefeld CM, Geisler C, Woetmann A, Odum N. Jak3, STAT3, and STAT5 inhibit expression of miR-22, a novel tumor suppressor microRNA, in cutaneous T-Cell lymphoma. *Oncotarget* 2015; 6 (24): 20555–69.
- Simon GT. The value of morphometry in the ultrastructural diagnosis of Mycosis fungoides. *Ultrastruct Pathol* 1987; 11 (5–6): 687–91.
- Smoller BR, Bishop K, Glusac E, Kim YH, Hendrickson M. Reassessment of histologic parameters in the diagnosis of mycosis fungoides. *Am J Surg Pathol* 1995; 19 (12): 1423–30.
- So EY, Ouchi T. The application of toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci* 2010; 3;6(7):675-81.
- Sokołowska-Wojdyło M, Olek-Hrab K, Ruckemann-Dziurdzińska K. Primary cutaneous lymphomas: Diagnosis and treatment. *Postep Dermatologii i Alergol* 2015; 32(5):368-383
- Sors A, Jean-Louis F, Pellet C, Laroche L, Dubertret L, Courtois G, Bachelez H, Michel L. Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood* 2006; 107 (6): 2354–63.
- Soudeyns H, Campi G, Rizzardi GP, Lenge C, Demarest JF, Tambussi G, Lazzarin A, Kaufmann D, Casorati G, Corey L, Pantaleo G. Initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection induces rapid stabilization of the T-cell receptor beta chain repertoire and reduces the level of T-cell oligoclonality. *Blood* 2000; 95 (5):

1743–51.

- Stadler R, Stranzenbach R. Molecular pathogenesis of cutaneous lymphomas. **Exp Dermatol** 2018; 27 (10): 1078–1083.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol** 2005; 17 (1): 1–14.
- Takeuchi O, Akira S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. **Microbes Infect** 2002; 4(9):887-95.
- Taşlıdere NŞ. Mikozis Fungoides yama evresi olan hastalarda DAR-BAND UVB ve DR-BAND UVB+ İzotretionin Tedavilerinin apopitoz üzerine etkileri ve bunun klinik yanıtla ilişkisinin karşılaştırılması. **Erciyes Üniversitesi Tıpta Uzmanlık Tezi**, Kayseri, 2010, s 81.
- Tefferi A, Wilcox RA. CME Information: Cutaneous T-cell lymphoma: 2016 Update and diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol** 2016; 91(1):151-65
- Terhorst D, Kalali BN, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. **Am J Clin Dermatol** 2010; 11 (1): 1–10.
- Terhune MH, Cooper KD. Gene rearrangements and T-cell lymphomas. **Arch Dermatol** 1993; 129 (11): 1484–90.
- Tracey L, Villuendas R, Dotor AM, Spiteri I, Ortiz P, García JF, Rodríguez Peralto JL, Lawler M, Piris MA. Mycosis fungoides shows concurrent deregulation of multiple genes involved in the TNF signaling pathway: An expression profile study. **Blood** 2003; 102 (3): 1042–1050.
- Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, Gniadecki R, Klemke C-D, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Pimpinelli N, Quaglino P, Ranki A, Scarisbrick J, Stadler R, Väkevä L, Vermeer MH, Whittaker S, Willemze R, Knobler R. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome – Update 2017. **Eur J Cancer** 2017; 77 : 57–74.
- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. **Curr Opin Immunol** 2002; 14 (1): 103–10.
- Valencak J, Schmid K, Trautinger F, Wallnöfer W, Muellauer L, Soleiman A, Knobler R, Haitel A, Pehamberger H, Raderer M. High expression of Dicer reveals a negative prognostic influence in certain subtypes of primary cutaneous T cell lymphomas. **J Dermatol Sci** 2011; 64 (3): 185–90.
- van Kester MS, Ballabio E, Benner MF, Chen XH, Saunders NJ, van der Fits L, van Doorn R, Vermeer MH, Willemze R, Tensen CP, Lawrie CH. miRNA expression profiling of mycosis fungoides. **Mol Oncol** 2011; 5 (3): 273–80.
- Vonderheid EC. On the diagnosis of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma. **J Cutan Pathol** 2006; 33(1):27-42.
- Wasik MA. Distinct miRNA profile in prognosis of early CTCL. **Blood** 2018, 131(7):711
- Web_1: Mini-review: An overview of T cell receptors. <https://www.bio-rad-antibodies.com/t-cell-receptor-minireview.html> (son güncelleme tarihi: 01.01.2019, alındığı tarih: 08.06.2019).
- Web_2: Toll-like receptors: very clever molecules. <https://www.abcam.com/content/toll-like-receptors-very-clever-molecules-1> (son güncelleme tarihi: 1.03.2019, alındığı

tarih: 15.8. 2019).

Web_3:ATCC. http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-294.aspx?geo_country=tr#characteristics (son güncelleme tarihi: 21.10.2019, alındığı tarih: 18.08. 2019).

Web_4: ATCC. http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2522?geo_country=tr#characteristics (son güncelleme tarihi: 21.10.2019, alındığı tarih: 18.08. 2019).

Web_5:miR-Tarbase: <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php> (son güncelleme tarihi: 15.09.2017, alındığı tarih: 1.1. 2019).

Web_6: Diana Tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) (son güncelleme tarihi: 15.02.2019 alındığı tarih: 1.1. 2019).

Web_7: miR.Path v3, <http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>) (son güncelleme tarihi: 15.02.2019, alındığı tarih: 2.1. 2019).

Web_8:KEGG. <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (son güncelleme tarihi: 15.08.2019, alındığı tarih: 4.4. 2019).

Web_9: String. <https://string-db.org/>. (son güncelleme tarihi: 13.09.2019, alındığı tarih: 4.4. 2019).

Web_10:Rain https://rth.dk/resources/rain/single_search.php?identifier=&organism=Human&submit=Search (son güncelleme tarihi: 24.12.2018, alındığı tarih: 25.4. 2019).

Web_11:IdentiClone.<https://invivoscribe.com/uploads/products/informationalDownloads/280076.pdf> (son güncelleme tarihi: 1.02.2018, alındığı tarih: 19.08. 2019).

Weiss LM, Hu E, Wood GS, Moulds C, Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in mycosis fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. **N Engl J Med** 1985; 313 (9): 539–44.

Whittaker SJ, Marsden JR, Spittle M, Russell Jones R, British Association of Dermatologists, UK Cutaneous Lymphoma Group. Joint British Association of Dermatologists and U.K. Cutaneous Lymphoma Group guidelines for the management of primary cutaneous T-cell lymphomas. **Br J Dermatol** 2003; 149(6):1095-1107.

Whittam LR, Calonje E, Orchard G, Fraser-Andrews EA, Woolford A, Russell-Jones R. CD8-positive juvenile onset mycosis fungoides: an immunohistochemical and genotypic analysis of six cases. **Br J Dermatol** 2000; 143 (6): 1199–204.

Willemze R, Hodak E, Zinzani PL, Specht L, Ladetto M. Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol** 2018; 29: iv30–iv40.

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJLM. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. **Blood** 2005; 105 (10): 3768–3785.

Willemze Rein, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. **Blood** 2019a; 133 (16): 1703–1714.

Willemze Rein, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The

- 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood* 2019b; 133 (16): 1703–1714.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009; 11 (3): 228–34.
- Wong HK, Mishra A, Hake T, Porcu P. Evolving Insights in the Pathogenesis and Therapy of Cutaneous T-cell lymphoma (Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome). *Br J Haematol* 2011; 155(2):150-66
- Wood GS. T-cell receptor and immunoglobulin gene rearrangements in diagnosing skin disease. *Arch Dermatol* 2001; 137 (11): 1503–6.
- Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, Veelken H, Kadin ME, Koh H, Heald P. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 1994; 103 (1): 34–41.
- Xu C, Wan C, Wang L, Yang H-J, Tang Y, Liu W-P. Diagnostic significance of TCR gene clonal rearrangement analysis in early mycosis fungoides. *Chin J Cancer* 2011; 30 (4): 264–72.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (80-)* 2003; 301(5633):640-3
- Yamashita T, Abbade LPF, Marques MEA, Marques SA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: clinical, histopathological and immunohistochemical review and update. *An Bras Dermatol* 2012; 87 (6): 817–830.
- Yassai MB, Naumov YN, Naumova EN, Gorski J. A clonotype nomenclature for T cell receptors. *Immunogenetics* 2009; 61(7):493-502
- Yoshikai Y, Clark SP, Taylor S, Sohn U, Wilson BI, Minden MD, Mak TW. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor α -chain. *Nature* 1985; 316(6031):837-40.
- Zucker-Franklin D, Pancake BA. The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Dermatol* 1994; 13 (3): 160–5.

8. ÖZGEÇMİŞ

Mücahit SEÇME 12.05.1990 tarihinde Isparta'da doğmuştur. İlkokul ve ortaokulu Denizli'nin Tavas ilçesinde Solmaz İlköğretim Okulunda tamamladı. 2008 yılında Tavas Zeybekler Anadolu Lisesinden mezun oldu ve aynı yıl Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne başladı. 2012 yılında Biyoloji eğitimini tamamladı. 2013 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. 2015 yılında PAÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı ve aynı bölümde doktora eğitimine başladı. Evli ve bir çocuk babasıdır.



9. EKLER

EK-1

Gene 560 (2015) 140–142



Contents lists available at ScienceDirect
Gene
journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene



microRNA -143 and -223 in obesity  CrossMark

Ismail Dogu Kilic^a, Yavuz Dodurga^{b,*}, Burcu Uludag^a, Yusuf I. Alihanoglu^a, Bekir Serhat Yildiz^a, Yasar Enli^c,
Mucahit Secme^b, H. Eren Bostanci^c

^a Fıratkale University, Medical Faculty, Department of Cardiology, Dicleli, Turkey
^b Fıratkale University, Medical Faculty, Department of Medical Biology, Dicleli, Turkey
^c Fıratkale University, Department of Biochemistry, Dicleli, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 November 2014
Received in revised form 21 January 2015
Accepted 26 January 2015
Available online 28 January 2015

Keywords:
Obesity
microRNA-143
microRNA-223

ABSTRACT

Background: Obesity alters endocrine and metabolic functions of adipose tissue and has been recognized as a chronic inflammatory disease, which in turn may contribute to the development of insulin resistance, type 2 diabetes, obesity-associated vasculopathy and cardiovascular disease. The pathogenesis of obesity involves many regulatory pathways including transcriptional regulatory networks, including microRNAs.

Methods: A total of 83 patients were included in the study. Patients were recruited from a cardiology outpatient clinic and were allocated into 3 age- and sex-matched groups according to their body mass index. Group 1 included 23 morbidly obese, group 2 30 obese, and group 3 30 normal or overweight subjects.

Results: In our study, we showed that miR-143 and miR-223 levels were significantly lower in groups 1 and 2 than the control group (normal BMI or overweight).

Conclusions: Obesity leads to alterations in miRNA expressions and miRNA-143 and -223s can be used as biomarkers for the metabolic changes in obesity.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity and related disorders are growing global health challenges. Obesity alters endocrine and metabolic functions of adipose tissue and has been recognized as a chronic inflammatory disease, which in turn may contribute to the development of insulin resistance, type 2 diabetes, obesity-associated vasculopathy and cardiovascular disease (Berg and Scherer, 2005). The pathogenesis of obesity involves many regulatory pathways including transcriptional regulatory networks (Weisberg et al., 2003). Recently, microRNA (miRNA) which can post-transcriptionally regulate a large number of genes have emerged as key molecules in obesity. MicroRNAs are a class of approximately 22 nucleotide length, single stranded, non-protein coding RNA sequences; they function as post-transcriptional regulators and bind to complementary sequences in the 3' untranslated regions of target mRNAs and resulting gene silencing (Mitchell et al., 2008; Zampetaki et al., 2012). The role of miRNAs in adipogenesis, adipocyte differentiation, fat metabolism, and insulin secretion and action has been increasingly recognized (McGregor and Choi, 2011).

miR-223 expression is deregulated in various diseases such as type 2 diabetes, influenza or hepatitis B infection and in inflammatory bowel disease, leukemia and lymphoma (Haneklaus et al., 2013). miR-143 which has a role in the adult adipose tissue related with obesity is a well known miRNA (Yi et al., 2011). It has been demonstrated that the levels of miRNAs are remarkably stable and reproducible (Glad et al., 2008). These findings aroused interest in the use of miRNAs as biomarkers in different clinical settings.

In this study, based on previous tissue studies, we studied levels of 2 miRNAs, namely microRNAs (miR)-143 and -223, and their relationship with myeloperoxidase (MPO), high sensitivity CRP (hs-CRP) and chitotriosidase as inflammatory markers.

2. Material and methods

2.1. Study subjects

A total of 83 patients were included in the study. Patients were recruited from the cardiology outpatient clinic and were allocated into 3 age- and sex-matched groups according to their body mass index (BMI). Patients with known coronary artery disease, severe valvular disease, atrial fibrillation, diabetes mellitus, known inflammatory diseases, thyroid disease and malignant disease were excluded from the study. Body mass index was calculated as weight divided by squared height. Patients were considered non-obese if their BMI was between 20.0 and 25.0 kg/m², obese if BMI was between 30.0–39.9 kg/m² and morbidly obese for BMI >40.0 kg/m². The study was approved by the local

Abbreviations: miRNA, microRNA; MPO, myeloperoxidase; BMI, body mass index; HOMA-IR, Homeostatic Model of Assessment of Insulin Resistance; WHR, Waist–Hip Ratio; WC, Waist circumference; HC, Hip circumference; TC, Total Cholesterol; LDL, Low Density Lipoprotein-Cholesterol; HDL, High Density Lipoprotein-Cholesterol; TG, Triglyceride; hsCRP, high sensitivity CRP; RBC Lysis solution, Red Blood Cell Lysis solution.
* Corresponding author.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.01.048>
0168-1115/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



RESEARCH ARTICLE

Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines

Canan Eroğlu¹ · Mücahit Seçme² · Gülsiren Bağcı² · Yavuz Dodurga²Received: 15 May 2015 / Accepted: 17 June 2015 / Published online: 30 June 2015
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015

Abstract Studies on genetic changes underlying prostate cancer and the possible signaling pathways are getting increased day by day, and new treatment methods are being searched for. The aim of the present study is to investigate the effects of ferulic acid (FA), a phenolic compound, on cell cycle, apoptosis, invasion, and colony formation in the PC-3 and LNCaP prostate cancer cells. The effect of FA on cell viability was determined via a 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) method. Total RNA was isolated with Tri Reagent. Expression of 84 genes for both cell cycle and apoptosis separately was evaluated by reverse transcriptase PCR (RT-PCR). Protein expressions were evaluated by Western blot analysis. Furthermore, apoptotic effects of FA were observed with terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay. Effects of FA on cell invasion and colony formation were determined using Matrigel chamber and colony assay, respectively. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) dose of FA was found to be 300 μM in PC-3 cells and 500 μM in LNCaP cells. According to RT-PCR results, it was observed that FA inhibited cell proliferation by increasing the gene expressions of ATR, ATM,

CDKN1A, CDKN1B, E2F4, RB1, and TP53 and decreasing the gene expressions of CCND1, CCND2, CCND3, CDK2, CDK4, and CDK6 in PC-3 cells. On the other hand, it was seen that FA suppressed cell proliferation by increasing in the gene expressions of CASP1, CASP2, CASP8, CYCS, FAS, FASLG, and TRADD and decreasing in the gene expressions of BCL2 and XIAP in LNCaP cells. In this study, protein expression of CDK4 and BCL2 genes significantly decreased in these cells. It could induce apoptosis in PC-3 and LNCaP cells. Also, it was observed that FA suppressed the invasion in PC-3 and LNCaP cells. Moreover, it suppressed the colony formation. In conclusion, it has been observed that FA may lead to cell cycle arrest in PC-3 cells while it may cause apoptosis in LNCaP cells.

Keywords Apoptosis · Cell cycle · Colony formation · Ferulic acid · Invasion · Prostate cancer

Abbreviations

FA	Ferulic acid
CDK	Cyclin-dependent kinase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick end labeling
AR	Androgen receptor

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13277-015-3689-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.



Investigation of the effects of a sulfite molecule on human neuroblastoma cells via a novel oncogene *URG4/URGCP*



Yavuz Dodurga^{a,*}, Mücahit Seçme^a, Canan Eroğlu^a, Gülşah Gündoğdu^b, Çığır Biray Avcı^c, Gülseren Bağcı^a, Vural Küçükataş^b, N. Lale Şatıroğlu-Tufan^d

^a Pamukkale University School of Medicine, Department of Medical Biology, Denizli, Turkey

^b Pamukkale University School of Medicine, Department of Physiology, Denizli, Turkey

^c Ege University School of Medicine, Department of Medical Biology, İzmir, Turkey

^d Ankara University School of Medicine, Department of Forensic Medicine, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 July 2015

Received in revised form 28 September 2015

Accepted 5 October 2015

Available online 23 October 2015

Keywords:

URG4/URGCP

Sulfite

Neuroblastoma

SH-SY5Y cells

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to determine the anticancer effect of sulfite on SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro conditions and elucidate underlying molecular mechanism of sulfite and explore its therapeutic activity.

Main methods: In this study, cytotoxic effects of sulfite in SH-SY5Y cells were detected over time in a dose dependent manner with the IC_{50} doses ranging from 0.5 to 10 mM. Genotoxic effect of sulfite was shown by comet assay. K_{12} doses in the SH-SY5Y cells were detected as 5 mM. Expression profiles of the target genes related to apoptosis and cell cycle control were determined by quantitative RT-PCR. Protein changes were determined by western blot analysis.

Key findings: *URG4/URGCP*, *CCND1*, *CCNE2*, *CDK4*, *CDK6*, *CDK8*, *E2F4* and *BCL-2* gene expression levels were significantly reduced and *RBI*, *TFS3*, *BAX*, *BCL2*, *CASP2*, *CASP3*, *CASP9* and *DAB2IP* gene expressions were significantly increased in dose group cells. The mechanism of this result may be related to sulfite dependent inhibition of cell cycle at the G1 phase by down-regulating *URG4/URGCP* or *CCND1*, *CDK4*, *CDK6* gene expression and stimulating apoptosis via the intrinsic pathway. Sulfite suppressed invasion and colony formation in SH-SY5Y cell line using matrigel invasion chamber and colony formation assay, respectively.

Significance: It is thought that sulfite demonstrates anticarcinogenesis activity by affecting cell cycle arrest, apoptosis, invasion, and colony formation on SH-SY5Y cells. Sulfite may be an effective agent for treatment of neuroblastoma as a single agent or in combination with other agents.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Neuroblastoma (NB) is a pediatric tumor that originated from the neural cells of the sympathetic nervous system. NB is the most frequent common extra-cranial solid tumor in early childhood malignancies [2]. In spite of extensive treatment for neuroblastoma, high stage NB tumors have poor prognosis with 20% to 40% overall survival. Therapeutic approaches to NB depend on the stage of the disease, age and biological prognostic factors related to the biological and clinical heterogeneity of neuroblastoma [2,21,22].

Sulfite and its salts with different ions such as sodium sulfite (Na_2SO_3), sodium bisulfite (sodium hydrogen sulfite; $NaHSO_3$), sodium metabisulfite ($Na_2S_2O_5$), potassium metabisulfite ($K_2S_2O_5$), calcium sulfite ($CaSO_3$), calcium hydrogen sulfite ($CaHSO_3$) and potassium

hydrogen sulfite ($KHSO_3$) are widely used in food preservation and drug industry as antimicrobial agents and antioxidants [6,20,30]. In addition to these, exogenous source of sulfite which organisms are exposed to, sulfite molecule is also produced endogenously by the metabolism of sulfur-including amino acids, such as methionine and cysteine [12,38] and from sulfate in response to stimulation with lipopolysaccharide (LPS) by human neutrophils [24]. Sulfite is a toxic molecule and needs to be detoxified by sulfite oxidase (SOX) which is a mitochondrial enzyme which functions by converting sulfite to a harmless sulfate in the body [15,16,24]. Sulfite may react with different humoral and cellular components and significant data have been obtained from in vitro studies suggesting that sulfites have the ability to react with various molecules of biological importance, including DNA [7,33]. It is suggested that sulfite radicals, which are produced during sulfite metabolism, can damage nucleic acids and cause mutations [7, 28,33] and these sulfite radicals can also react with lipids and proteins [10,41]. However, certain effects and activities of sulfite on cellular functions are not very well known. Moreover, little is known about the role

* Corresponding author at: Pamukkale University, Dept. of Medical Biology, Kınık Kampüsü (Marifetli) Hisar Kat:3 Kınık, Denizli, Turkey.
E-mail address: yavuzdodurga@gmail.com (Y. Dodurga).



Research paper

Ferulic acid decreases cell viability and colony formation while inhibiting migration of MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cells in vitro



Umut Fahrioğlu^{a,*}, Yavuz Dodurga^b, Levent Elmas^b, Mûcahit Seçme^b

^a Near East University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Nicosia, North Cyprus

^b Fırat University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics, Diyarbakir, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2015

Accepted 25 October 2015

Available online 27 October 2015

Keywords:

Ferulic acid
Pancreatic cancer
Treatment
Apoptotic genes
Cell cycle genes

ABSTRACT

Novel and combinatorial treatment methods are becoming sought after entities in cancer treatment and these treatments are even more valuable for pancreatic cancer. The scientists are always on the lookout for new chemicals to help them in their fight against cancer. In this study, we examine the effects of ferulic acid (FA), a phenolic compound, on gene expression, viability, colony formation and migration/invasion in the cultured MIA PaCa-2 human pancreatic cancer cell. Cytotoxic effects of FA were determined by using trypan blue dye exclusion test and Cell Titer-Glo (CTG) assay. K₅₀ dose in MIA PaCa-2 cells was detected as 500 µM/ml at the 72nd hour. Expression profiles of certain cell cycle and apoptosis genes such as CCND1 (cyclin D1), CDK6, CDK8, ERK, p21, p16, p53, caspase-3, caspase-9, caspase-8, caspase-10, Bcl-2, BCL-XL, BID, DR4, DR5, JAK1, TRADD, PAF1, ATRX, Bax, Akt, PTEN, PUMA, NOXA, MMP2, MMP9, TIMP1 and TIMP2 were determined by real-time PCR. The effect of FA on cell viability was determined by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Additionally, effects of FA on colony formation and invasion were also investigated. It was observed that FA caused a significant decrease in the expression of CCND1, CDK 4/6, Bcl2 and caspase 8 and 10 in the MIA PaCa-2 cells while causing an increase in the expression of p53, Bax, PTEN caspase 3 and 9. FA was observed to decrease colony formation while inhibiting cell invasion and migration as observed by the BioCoat Matrigel Invasion Chamber guide and colony formation assays. In conclusion, FA is thought to behave as an anti-cancer agent by affecting cell cycle, apoptotic, invasion and colony formation behavior of MIA PaCa-2 cells. Therefore, FA is placed as a strong candidate for further studies aimed at finding a better, more effective treatment approach for pancreatic cancer.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Pancreatic cancer is in the top five among the cancer related deaths. With a poor prognosis and a 5-year survival rate around 5–6%, pancreatic cancer cases are difficult to treat. The treatment options also remain limited with patient survival not exceeding 6 months

Abbreviations: FA, Ferulic acid; CCND1, Cyclin D1; CDK4, Cyclin Dependent Kinase 4; CDK6, Cyclin Dependent Kinase 6; ERK, Erythroblastic leukemia virus oncogene; BCL-XL, B-cell lymphoma-extra large; BID, Bcl-2 Interacting Domain Death Agonist; DR4, DR5, Death receptor 4; DR5, Death receptor 5; FADD, Fas-Associated protein with Death Domain; TRADD, Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein; PAF1, poly ADP ribose polymerase; ATRX, Apoptotic protease activating factor 1; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis; MMP2, Matrix metalloproteinase-2; MMP9, Matrix metalloproteinase-9; TIMP1, TIMP metalloproteinase inhibitor 1; TIMP2, TIMP metalloproteinase inhibitor 2; ROS, Reactive Oxygen Species; DNA, Deoxyribonucleic Acid; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; IC₅₀, Half maximal inhibitory concentration; cDNA, Complementary Deoxyribonucleic acid; RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction; qPCR, Quantitative real-time polymerase chain reaction; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; AACT, Complementary C; mRNA, Messenger Ribonucleic Acid; MAPK, Mitogen-activated protein kinases; PKC, Phosphoinositide 3-kinase; TGF-β, Transforming growth factor beta; HEC, Hepatic carcinoma cell.

* Corresponding author.

E-mail addresses: umut.fahrioglu@gmail.com, umut.fahrioglu@neu.edu.tr (U. Fahrioglu).

(Reynolds & Folloder, 2015; Seicean, 2015; Zhu & Yuan, 2015). Since 80% of the patients present with metastatic or locally advanced pancreatic cancer, they are no longer eligible for surgical treatment. Gemcitabine treatment has a limited success due to natural resistance. This had led to the development of new targeted therapies in pancreatic cancer that includes passive and specific immunotherapies (Reynolds & Folloder, 2015; Seicean, 2015). Novel approaches and combinatorial treatment methods are today's sought after entities in cancer treatment. Among the chemicals investigated by the current literature for the cancer treatment, some are already in use in Chinese herbal medicine.

Ferulic acid (FA; 4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid), a phenolic compound, is one such chemical, that is a potent antioxidant (Etsuka et al., 2014; Mancuso & Santangelo, 2014; Wang et al., 2011). FA is naturally present in many fruit and vegetables such as bananas, citrus fruit, bamboo shoots, eggplants and cabbages. It is also found in other common food items such as grain bran, whole grain food and coffee. The daily intake from these common food items vary between 20 mg to 1 g (Hoffman & Katan, 1998; Narasimhan, Chinnaiyan, & Karundevi, 2015; Wang et al., 2011). In China, FA is already in use for the treatment of angina pectoris and hypertension (Hou, Yang, Zhao, & Yuan, 2004). In the past few years, due to its various therapeutic effects ranging



Research paper

Investigation of anticancer mechanism of oleuropein via cell cycle and apoptotic pathways in SH-SY5Y neuroblastoma cells

Mücahit Seçme^a, Canan Eroğlu^b, Yavuz Dodurga^{a,*}, Gülsüren Bağcı^a^a Pamukkale University, School of Medicine, Department of Medical Biology, Denizli, Turkey^b Necmettin Erbakan University, School of Medicine, Department of Medical Biology, Konya, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2016

Accepted 22 March 2016

Available online 24 March 2016

Keywords:

Neuroblastoma

Oleuropein

Cell cycle

Apoptosis

ABSTRACT

Neuroblastoma is one of the most common types of pediatric tumors that can spread quickly in neuronal tissues. Oleuropein which is active compound of olive leaves, belongs to polyphenols group and has antioxidant, anti-microbial, anti-inflammatory, anti-hypertensive and anti-carcinogenic effects. The aim of the study is to determine the therapeutic effects of oleuropein on cell proliferation, invasion, colony formation, cell cycle and apoptotic mechanisms in SH-SY5Y neuroblastoma cell line under *in vitro* conditions. The effect of oleuropein on cell viability was determined by XTT method. 84 cell cycle control and 84 apoptosis related genes were evaluated by RT-PCR. Effects of oleuropein on apoptosis were researched by TUNEL assay. Protein expressions were determined by western blot analysis. Effects of oleuropein on cell invasion, colony formation and migration were detected by matrigel-chamber, colony formation assay and wound-healing assay, respectively. IC_{50} value of oleuropein in SH-SY5Y cells was detected as 350 μ M at 48h hours. It is determined that oleuropein causes cell cycle arrest by down-regulating of *Cyln11, Cyln22, CyclinD3, CDK4, CDK5* and up-regulating of *p53* and *CDKN2A, CDKN2A, CDKN1A* gene expressions. Oleuropein also induces apoptosis by inhibiting of *Bcl-2* and activating of *Bax, caspase-9* and *caspase-3* gene expressions. Apoptotic cell ratio was found 36.4 \pm 3.27% in oleuropein dose group. Oleuropein decreased invasion in SH-SY5Y cells and suppressed colony numbers in ratio of 53.6 \pm 4.7%. Our results demonstrated that oleuropein can be a therapeutic agent in the treatment of neuroblastoma.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neuroblastoma (NB) is a pediatric tumor of the autonomic nervous system and originated from precursor cell derived from the neural-crest tissues (Brodeur, 2003; Maris, 2010). NB is the most frequent common extra-cranial solid tumor in early childhood malignancies and is responsible for approximately 15% of all pediatric cancer deaths. Despite extensive treatment for neuroblastoma, high stage NB tumors have poor prognosis with 20% to 40% overall survival (Brodeur, 2003; Maris, 2010; Maris et al., 2007). NB is a highly heterogeneous disease both biologically and clinically, thus, therapeutic approaches to NB depend on the stage of the disease, age and biological prognostic factors (Maris et al., 2007; Jiang et al., 2011). In view of these cases, studies about effective and novel class agents should be carried out or new treatment strategies are needed for neuroblastoma.

Reported large epidemiological studies in several countries demonstrated that Mediterranean region has a significantly reduced all-cause mortality rate (Grosso et al., 2013). The Mediterranean diet is associated with decreased incidence of cardiovascular diseases, cancer and neurodegenerative disorders. The protective effects were attributed to rich fruits, vegetables, whole grains and olive products, which have powerfully antioxidants and biologically active compounds (Renaud et al., 1995). Mediterranean diet includes high consumption of olive products have a plenty source of polyphenols such as oleuropein (OLE) and its derivatives, including hydroxytyrosol (HT), which have strong free radicals scavenging activities and inhibitory effects to chemical oxidation of LDL (Stupans et al., 2002; Visioli et al., 1998b).

Oleuropein, belongs to the secoiridoids, a group coumarin-like compounds, is the precursor of olive oil secoiridoids and is abundantly present in the olive leaves and fruit (Gökasa et al., 2007; Servili et al., 2009). Previous *in vivo* and *in vitro* studies reported that oleuropein has a wide variety of biological activities such as anti-microbial (Bisignano et al., 1999), anti-viral (Lee-Huang et al., 2003), antioxidant (De la Puerta et al., 2001), anti-hypertensive (Khayyal et al., 2002), anti-atherogenic (Carluccio et al., 2003), hepatoprotective (Domitrovic et al., 2012), neuroprotective (Bazoti et al., 2006), anti-inflammatory (Visioli et al., 1998a), anti-aging (Katsiki et al., 2007) and anti-diabetic (Al-Azzawi and Alhamdani, 2006). Additionally, anti-carcinogenic effects of

Abbreviations: NB, Neuroblastoma; OLE, Oleuropein; XTT, [2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-tetrazolium-5-carboxanilide]; TUNEL, mediated dioxetidine triphosphate (dUTP)-digoxigenin nick-end labeling; CDK, Cyclin dependent kinase; DMEM, dimethylsulfoxide; HT, Hydroxytyrosol.

* Corresponding author at: Pamukkale University Dept of Medical Biology, Kırıkkampüsü (Mehmetli) (İzmir) Kırıkk / 08021.

E-mail address: yavuzdodurga@gmail.com (Y. Dodurga).



Contents lists available at ScienceDirect

Schizophrenia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/schres

An evaluation of the differences in DNA damage in lymphocytes and repair efficiencies in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder

Osman Zulkif Topak ^{a,*}, Osman Ozdel ^{a,1}, Yavuz Dodurga ^{b,2}, Mucahit Secme ^{b,2}^a Department of Psychiatry, University of Pamukkale, Denizli, Turkey^b Department of Medical Biology, University of Pamukkale, Denizli, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2018

Received in revised form 15 June 2018

Accepted 19 June 2018

Available online 28 June 2018

Keywords:

Schizophrenia

Schizoaffective disorder

DNA damage

DNA repair

ABSTRACT

Schizophrenia and schizoaffective disorder are chronic and debilitating psychiatric disorders. The present study was designed to determine DNA damage in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder to assess the roles of oxidative metabolism and DNA repair mechanisms in this process, to assess the contribution of drugs, and thus to demonstrate the differences between schizophrenia and schizoaffective disorder. Thirty schizophrenia and 30 schizoaffective disorder patients, each having at least five years of disease history, aged between 18 and 60 years with no physical or neurological diseases, and 30 healthy volunteers participated in the study. Psychometric scales were applied, and 5 ml of blood was taken from all participants. The DNA damage was measured in lymphocytes by the comet assay method; the total oxidative parameters by HPLC; OGG1 and NER1 gene expressions by real-time PCR; and the role of drugs by *in vitro* assays. The most important finding in this study was that patients with schizophrenia had significantly greater DNA damage than schizoaffective disorder patients and the controls. This study also provides evidence of high oxidative stress statuses and inadequate DNA repair capacities in patients with schizophrenia. Moreover, psychotropic drugs did not induce any DNA damage in the lymphocytes according to *in vitro* analyses. The use of clozapine and adequate repair processes of the patients were the decisive factors in the prevention of DNA damage. The results of this study provide a re-examination of schizoaffective disorder within the schizophrenia spectrum and indicate that schizoaffective disorder may be considered a different diagnostic category.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia and schizoaffective disorder are chronic and disabling psychiatric disorders, the etiologies of which continue to be confounding and elusive (Soygur et al., 2007). Neurodegenerative and neurodevelopmental factors have been implicated in the etiologies of both conditions, but these disorders are frequently considered together in studies. As a result, very little is known about the etiological factors specific to schizoaffective disorder (Kaplan and Sadock, 2004; Malhi et al., 2008). One of the recent intriguing fields is genetics.

Genotoxicity, a term that describes mutations that cause structural changes in deoxyribonucleic acid (DNA) or that break the helix of

DNA (Kest, 1998), may act as a predisposing factor for both schizophrenia and schizoaffective disorders. Reactive oxygen species cause oxidative DNA damage, react with cell membrane proteins, and prevent the intake of enzymes or neurotransmitters involved in natural processes (Dizlaroglu, 1999; Gezeroglu et al., 2007). The use of comet assays in clinical trials has shown increased DNA damage related to many diseases, such as breast cancer (Rajeswari et al., 2000) and Alzheimer's disease (Migliore et al., 2005), and contributed significantly to the research efforts to explain the pathogenic mechanisms of these diseases. DNA damage has also been revealed in psychiatric patient groups by the use of comet analyses. In the study by Andreazza et al. (2007), outpatients with bipolar disorder were shown to have more DNA damage than controls, and this damage was related to the severity of the disease symptoms. DNA damage has also been observed in schizophrenia patients (Muraleshwaran et al., 2015; Psimadas et al., 2004). This knowledge revealed the need to study DNA damage processes.

Studies evaluating DNA damage have mostly focused on oxidative processes. In the evaluation of DNA damage, the repair mechanisms that cells can develop to repair such damage and maintain their genomic integrity must be considered, as well as the oxidative processes.

* Corresponding author at: Pamukkale University Department of Psychiatry, Kınık Campus, Pamukkale, Denizli, Turkey.

E-mail address: osmanzulkiftopak@cgik.gov.tr (O.Z. Topak).

¹ Address: Pamukkale University Department of Psychiatry, Kınık Campus, Pamukkale, Denizli, Turkey.

² Address: Pamukkale University Department of Medical Biology, Kınık Campus, Pamukkale, Denizli, Turkey.



The cytotoxic and genotoxic effects of daidzein on MIA PaCa-2 human pancreatic carcinoma cells and HT-29 human colon cancer cells

Gülşah Gundogdu^a, Yavuz Dodurga^b, Melhem Cetin^c, Mucahit Secme^b and Betül Cicek^a

^aDepartment of Physiology, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey; ^bDepartment of Medical Biology, Faculty of Medicine, Fatsiullah University, Denizli, Turkey; ^cDepartment of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ataturk University, Erzurum, Turkey

ABSTRACT

Daidzein (DZ) has anti-inflammatory and antioxidant effects, as well as the dose-dependent inhibition effect on cancer cells. In this study, the cytotoxic and genotoxic effects of DZ on HT-29 (human colorectal adenocarcinoma cells) and MIA PaCa-2 (human pancreatic cancer cells) cell lines were determined using the XTT method and Comet assay, respectively. IC₅₀ concentrations of DZ were found to be 200 µM in both MIA PaCa-2 and HT-29 cells treated with DZ for 48 hours (h). When the cells were treated with 200 µM of DZ for 48 h, DNA damage was observed in both cell lines. DNA tail length (TL), tail moment (TM), and tail intensity (TI) increased more in MIA PaCa-2 cells treated with 200 µM of DZ than those in the control cell (untreated MIA PaCa-2 cell) group ($p < 0.01$). However, only DNA-TI and DNA-TM exhibited higher increases in HT-29 cells treated with 200 µM of DZ than those in the control cell (untreated HT-29 cell) group ($p < 0.01$). This shows that DZ has cytotoxic and genotoxic effects on both cell lines. The observed genotoxic effects of DZ still need to be confirmed in additional future studies.

ARTICLE HISTORY

Received 24 December 2017
Revised 4 September 2018
Accepted 28 September 2018

KEYWORDS

Cancer cells; comet assay; cytotoxic and genotoxic effect; daidzein; XTT

Introduction

Cancer is the second-leading cause of death worldwide, and about 70% of these deaths occur in middle- and low-income countries. In 2015, cancer was responsible for 8.8 million deaths (WHO 2017). Defective components in damaged DNA and their repair play important roles in the development and progression of various types of cancer (Majidinia and Yousefi 2017).

Colorectal cancer (CC), one of the most common types of cancer in the world, is also the second and third most common epithelial malignancy in women and men, respectively. The incidence rates of CC are lower in less developed countries than they are in more developed ones. Furthermore, CC accounts for about 10% of cancer-related deaths in the western world. Potential causes of the cancer incidence increasing in developed countries (such as the United States of America and European countries) include unhealthy dietary habits, aging populations, obesity, smoking, and low levels of physical exercise (Lee et al. 2011, Kuipers et al. 2015, Shafiq et al. 2016, Tariq and Ghias 2016). CC begins with polyps (hyperplastic polyp, tubular adenoma, colorectal adenocarcinoma, etc.) developing on the epithelial lining of the colon or rectum, advancing slowly over years. Environmental and genetic factors play a significant role in the pathogenesis of CC. Furthermore, dietary factors are major aspects involved in the etiology of CC and are responsible for 70–90% of cases (Bardhan and Liu 2013, Pericic et al. 2013). While there have been gradual advancements in the treatment of CC, it

remains incurable once it has reached the most advanced stages. Therefore, new prophylactic approaches are needed to decrease the incidence of CC. According to epidemiological data, the incidence of CC in Asian countries is relatively low. This may be due to intake of soybean-based foods, which contain isoflavones (such as DZ and genistein), in the diets of Asian populations (Lee et al. 2011). DZ and genistein have chemopreventive and chemotherapeutic effects (Kim et al. 2014). The high expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) is frequently observed in tumor xenografts and chemoresistant CC cells. Thus, the combination of an anticancer agent and a nonsteroidal anti-inflammatory may improve chemosensitivity in chemorefractory CC cells (Rahman et al. 2012).

Pancreatic cancer (PC), the fourth most common cause of cancer deaths, is an aggressive cancer with a five-year survival rate of <5% and a median survival of 4–6 months. PC incidence has been increasing in recent years. The success of early diagnosis of PC followed by favorable curative care is limited due to its abrupt development and the absence of specific symptoms. The treatment alternatives of PC include surgery, adjuvant chemotherapy, and radiotherapy. PC has high metastatic potential, and it shows high resistance or limited susceptibility to classic anticancer agents and radiotherapy (Li et al. 2015, Teague et al. 2015, Zhao et al. 2015, Li et al. 2016, Yamaguchi et al. 2015).

Genotoxicity has a destructive effect on a cell's genetic material (DNA and RNA), impairing its integrity. Genotoxins,

CONTACT Melhem Cetin meloring@atauni.edu.tr; meloring@hotmail.com Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ataturk University, Erzurum, Turkey

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Received: 12 June 2018 | Accepted: 14 August 2018

DOI: 10.1002/jcb.27623



RESEARCH ARTICLE

WILEY *Journal of Cellular Biochemistry*

The determination of the potential anticancer effects of *Coriandrum sativum* in PC-3 and LNCaP prostate cancer cell lines

Levent Elmas¹ | Mücahit Secme¹ | Ramazan Mammadov² | Umut Fahrioglu³ | Yavuz Dodurga¹ ¹Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey²Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Pamukkale University, Denizli, Turkey³Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Near East University, Nicosia, Cyprus

Correspondence

Yavuz Dodurga, Department of Medical Biology, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli 20160, Turkey.
Email: yavuzdodurga@gmail.com

Abstract

Coriander (*Coriandrum sativum* L.) is such an herb from the Apiaceae family, used both for its medicinal and nutritional properties for many centuries. In this study, the effects of *C. sativum* extract on gene expression, viability, colony formation, migration, and invasion of PC-3 and LNCaP prostate cancer cell lines have been investigated. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) dose in PC-3 and LNCaP cells was detected to be 2 and 5 mg/mL at the 24th hour, respectively. *C. sativum* extracts have been observed to cause a significant decrease in the expression of *Akt* and *Bcl-2* in the PC-3 cells and just *Akt* in LNCaP cells while increasing in the expression of *p53*, *caspase-9*, *caspase-10*, *PTEN*, *DR3*, *TRADD*, *PUMA*, and *NOXA*. *DR4* expression was increased in LNCaP cell line but not PC-3, and *APAF* and *Bid* had increased expression in PC-3 but not the LNCaP cells. Our observations have shown that *C. sativum* extract decreased colony formation while inhibiting cell invasion and migration. Cell migration was hindered in PC-3 but not the LNCaP cells. In conclusion, this data present a valuable addition to the very limited data available out there on the potential use of *C. sativum* in prostate cancer treatment.

KEYWORDS

coriander, herbal medicine, LNCaP, PC-3, prostate cancer

1 | INTRODUCTION

Herbs, such as Coriander (*Coriandrum sativum* L.), and their bioactive compounds have gained popularity in recent years for their medicinal and nutritional properties. Coriander seeds, roots, and leaves have all been used

in fields ranging from foods and drugs to cosmetics, including diverse medical treatments due to their immune-modulatory, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties.¹⁻⁴

Lipids, essential oils, water-soluble compounds, and polyphenols are the four major groups of bioactive compounds in the seeds and the aerial portions of coriander. Phenolic compounds are the main components of the aerial parts where the essential oils like linalool is mainly found in the seeds. However, the exact proportions

Abbreviations: CAM, complementary and alternative medicine; CDK, cyclin-dependent kinase; cDNA, DNA complementary to RNA; CTG, CellTiter-Glo; IC₅₀, half maximal inhibitory concentration; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase.

EK-9



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik
Kurulu



Sayı :60116787-020/49870
Konu :Başvurunuz hk.

03/08/2017

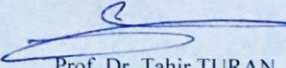
Sayın Doç. Dr. Yavuz DODURGA

İlgi :25.07.2017 tarihli dilekçeniz.

İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "**Mikozis fungoides tanılı hastalarda toll Benzeri Reseptörler ile ilişkili sinyal iletim yolağı ve MiRNA'ların ekspresyon profillerinin ve T Hücre Klonitesinin Belirlenmesi**" konulu çalışmanız **01.08.2017 tarih ve 10 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. Tahir TURAN
Başkan