

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

MİYELODİPLASTİK SENDROM (MDS) VE AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML)
HASTALARININ KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
(MKH) KARAKTERİZASYONU İLE GEN/MİKRORNA (miRNA) İFADE
PROFİLLERİNİN SAĞLIKLI KONTROLLER İLE KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

HAKAN ÖZDOĞAN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

YRD. DOÇ. DR. BALA GÜR DEDEOĞLU

MART

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Hakan ÖZDOĞAN



ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU danışmanlığında Hakan ÖZDOĞAN tarafından hazırlanan bu çalışma 01/03/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Osman İLHAN

İmza:



Üye: Prof. Dr. Ferit AVCU

İmza:



Üye: Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY

İmza:



Üye: Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve Akut Miyeloid Lösemi (AML) hastalarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) karakterizasyonu ile gen/ mikroRNA (miRNA) ifade profillerinin sağlıklı kontroller ile karşılaştırmalı analizi

Hakan Özdoğan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve Akut Miyeloid Lösemi (AML) kemik iliğindeki kök hücreleri etkileyen klonal hastalıkların heterojen gruplarını temsil etmektedir. Mikroçevre direkt olarak hematopoetik hücrelerle etkileşime girerek ve/veya düzenleyici moleküller salgılayarak hematopoezi düzenler. Hematopoetik mikroçevrenin ana bileşeni mezenkimal kök hücreler (MKH)'dir. MKH'lerin hastalık patogenezinin katkısı yeterince araştırılmamıştır.

Bu çalışmada 22 MDS/AML hastası ve 8 sağlıklı kontrol kemik iliğinden MKH'ler izole edilmiş ve hücre kültürlerinde çoğaltılmıştır. MKH karakterizasyonu için yüzey antijen özellikleri akım sitometrisiyle analiz edilmiştir. MKH'lerin osteojenik ve adipogenik farklılaşma potansiyelleri test edilmiştir. MKH'lerden RNA izole edilmiş, daha sonra miRNA mikrodizin teknolojisiyle miRNA ifade profilleri analiz edilmiş ve farklılık gösteren miRNA'lar eş zamanlı PZR ile doğrulanmıştır. Biyoinformatik analizler ile miRNA'lar tarafından düzenlenen edilen genler belirlenip mRNA seviyeleri hastalar ve normal kontrollerde karşılaştırılmıştır. DICER1 gen ifade profili hasta ve normal örnekler arasında incelenmiştir.

2016, 189 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kemik iliği mikroçevresi, Mezenkimal Kök Hücre (MKH), mikroRNA (miRNA), Miyelodisplastik Sendrom (MDS), Akut Miyeloid Lösemi (AML).

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

Characterization and Gene/MicroRNA Expression Profile Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid leukemia (AML) Patients and Comparison with Healthy Controls

Hakan Ozdogan

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assist. Prof. Bala Gur Dedeoglu

Myelodysplastic syndrome (MDS) and Acute Myeloid Leukemia (AML) represent the heterogenous groups of clonal diseases that affect the stem cells in bone marrow. The microenvironment can regulate hematopoiesis by interacting directly with hematopoietic cells and/or by secreting regulatory molecules. The key component of the hematopoietic microenvironment is mesenchymal stem cells (MSCs). The contribution of MSCs to disease pathogenesis has remained poorly explored.

In this study MSCs were isolated from the bone marrow of the 22 MDS/AML patients and 8 controls and expanded in the cell culture. The surface antigen features of MSCs were analyzed by flow cytometry for MSC characterization. The osteogenic and adipogenic differentiation potentials of MSCs were also tested. RNA isolation was performed from MSCs and then miRNA expression profiles of MSCs were analysed by microarray technology. Differentially expressed miRNAs were validated by qRT-PCR. The genes regulated by miRNAs were identified by bioinformatic analyses and their mRNA levels were compared in patients and controls. DICER1 expression profiles were also be investigated in normal and patients.

2016, 189 pages

Keywords: Bone marrow microenvironment, Mesenchymal stem cell (MSC), microRNA (miRNA), Myelodysplastic Syndrome (MDS), Acute Myeloid Leukemia (AML).

TEŞEKKÜR

Tezin başından sonuna beni yönlendiren, hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen danışmanım Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na,

Tez çalışmasının her aşamasında bana sonsuz destek sağlayan, emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya'ya,

Projenin gerçekleşmesindeki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Osman İlhan'a,

Deneilerimdeki yardımları için Blm. Uzm. Alp Aydos'a ve Blm. Uzm. Yasemin Öztumur'a ve tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine ve BGD Lab üyelerine,

Çalışmaya katkılarından dolayı Blm. Uzm. Sevil Köse'ye, Blm. Uzm. İrem Akar Soycan'a, Blm. Uzm. Yağız Anasız'a ve laboratuvar teknisyeni Ebubekir Akbayır'a,

Tezin en önemli ve zor adımı olan örneklerin temininde bana büyük destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Ferit Avcu'ya ve Sayın Doç. Dr. Zeynep Arzu Yeğın'e, hücre kültürlerinde büyük emeği geçen Biyolog Meral Sarper ve Biyolog Pınar Elçi'ye,

Tez çalışmamı 112S306 numaralı proje kapsamında desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu'na (TÜBİTAK-SBAG),

Beni büyüten, her zaman yanımda olan, bana her zaman destek veren, haklarını asla ödeyemeyeceğim canım annem Nurdagül Özdoğan'a ve babam Hasan Özdoğan'a,

Sonsuz teşekkürler.

Hakan ÖZDOĞAN

Ankara, 2016



Ağabeyim Mustafa ÖZDOĞAN'a

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. HEMATOPOEZ	4
2.2. MİYELODİSPLASTİK SENDROM (MDS)	7
2.2.1. TANIM VE TARİHÇE.....	7
2.2.2. EPİDEMİYOLOJİ	7
2.2.3. SINIFLANDIRMA	8
2.2.4. PROGNOZ.....	11
2.2.5. ETİYOLOJİ	13
2.2.6. MDS PATOLOJİSİ.....	14
2.2.6.1. Sitogenetik Değişimler	14
2.2.6.2. Moleküler Değişimler	16
2.2.6.2.1. Sinyal İletim Değişikliği	16
2.2.6.2.2. Transkripsiyon Faktörleri ve Hücre-Döngüsü Kontrol Değişiklikleri	18
2.2.6.3. Epigenetik Değişiklikler	19
2.3. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML)	21
2.3.1. TANIM VE TARİHÇE.....	21
2.3.2. EPİDEMİYOLOJİ	22

2.3.3. SINIFLANDIRMA	23
2.3.4. PROGNOZ.....	24
2.3.5. ETİYOLOJİ	26
2.3.6. AML PATOLOJİSİ	27
2.3.6.1. Genetik Değişiklikler	27
2.3.6.1.1. Anormal Çoğalma	27
2.3.6.1.2. Farklılaşmanın Durması	28
2.3.6.2. Epigenetik Değişiklikler	33
2.4. KÖK HÜCRELER.....	34
2.4.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (MKH).....	34
2.5. KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ.....	37
2.5.1. KEMİK VE KEMİK İLİĞİ.....	37
2.5.2. KEMİK İLİĞİNDEKİ HKH NİŞİ	38
2.5.2.1. Osteoblastik Niş	39
2.5.2.2. Vasküler Niş	40
2.5.2.3. Osteoblastik ve Vasküler Niş Arasındaki İlişki	42
2.5.3. MDS VE AML'DE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ.....	44
2.6. MİKRORNA.....	51
2.6.1. MİKRORNA'LARIN KEŞFİ	51
2.6.2. MİKRORNA'LARIN BİYOGENEZİ	53
2.6.3. MİKRORNA'LARIN ETKİ MEKANİZMASI.....	54
2.6.4. MİKRORNA'LAR VE KANSER	55
2.6.5. HEMATOPOEZİN DÜZENLENMESİNDE MİKRORNA'LAR	56
2.6.6. MKH'LER VE MİKRORNA'LAR.....	59
2.6.7. KÖK HÜCRE NİŞİ VE MİKRORNA'LAR	60
2.6.8. MDS VE AML'DE MİKRORNA'LAR.....	61
2.6.8.1. MDS'de MikroRNA'lar.....	61
2.6.8.2. AML'de MikroRNA'lar.....	64
3. GEREKÇE VE AMAÇ	67
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	70

4.1. MATERYAL	70
4.1.1. HASTA VE SAĞLIKLI KONTROL ÖRNEKLER.....	70
4.1.2. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN MATERYALLER.....	71
4.1.3. RNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN MATERYALLER.....	72
4.1.4. MİKRODİZİN ÇİPLERİ VE KULLANILAN MATERYALLER	72
4.1.5. cDNA SENTEZ REAKSİYONU KİTLERİ, EŞ ZAMANLI PZR KİTLERİ VE CİHAZLAR.....	72
4.1.6. PRİMERLER.....	73
4.2. YÖNTEM	75
4.2.1. KEMİK İLİĞİ ASPİRASYON ÖRNEKLERİNDEN MONONÜKLEER HÜCRELERİN (MNH) AYRIŞTIRILMASI.....	75
4.2.2. MKH İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ	75
4.2.3. MKH'LERİN KARAKTERİZASYONU.....	76
4.2.3.1. Morfolojik Analiz	76
4.2.3.2. Yüzey Molekül Analizi (Akım Sitometri).....	76
4.2.3.2.1. Hücrelerin Hazırlanması.....	76
4.2.3.2.2. Hücrelerin İşaretlenmesi.....	76
4.2.3.2.3. İşaretlenmiş Hücrelerin Yüzey Molekül Analizi.....	77
4.2.3.3. Farklılaşma Analizi.....	77
4.2.3.3.1. Adipojenik Farklılaştırma.....	77
4.2.3.3.2. Osteojenik Farklılaştırma	77
4.2.4. MKH'LERİN DONDURULUP SAKLANMASI	78
4.2.5. RNA İZOLASYONU	78
4.2.6. RNA MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	78
4.2.7. RNA BÜTÜNLÜĞÜNÜN KONTROLÜ	79
4.2.7.1. Agaroz Jel Elektroforezi	79
4.2.7.2. Reaktifler	79
4.2.7.2.1. 5X TBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA).....	79
4.2.7.2.2. DNA Ladder (100 Bç DNA Ladder).....	79
4.2.7.2.3. %1'lik Agaroz Jel Hazırlanması.....	79
4.2.7.2.4. %1'lik Agaroz Jelde RNA Örneklerinin Yürütülmesi	80

4.2.8. MİKRODİZİN ÇALIŞMASININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ.....	80
4.2.9. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİ.....	81
4.2.9.1. Normalizasyon.....	81
4.2.9.2. İstatistiksel Analizler.....	81
4.2.9.2.1. Anlamlı Olarak Farklılık Gösteren MiRNA'ların Belirlenmesi.....	81
4.2.9.2.2. Kümeleme Analizi.....	81
4.2.10. MİRNA'LARIN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI.....	82
4.2.10.1. MiRNA'lardan Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi.....	82
4.2.10.2. Mikrodizin Analizi Sonucu Seçilen MiRNA'ların İfade Farklılığının Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması.....	82
4.2.11. MİRNA HEDEF GENLERİNİN BELİRLENMESİ.....	83
4.2.12. YOLAK ANALİZLERİ.....	83
4.2.13. MİRNA HEDEF GENLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI VE DICER1 GENİNİN İFADE ANALİZİ.....	83
4.2.13.1. mRNA'lardan Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi.....	83
4.2.13.2. Seçilen mRNA'ların İfade Farklılığının ve DICER1 Geninin Eş Zamanlı PZR Yöntemi ile Araştırılması.....	83
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	84
5.1. MKH'LERİN KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR.....	84
5.1.1. MORFOLOJİK ANALİZLER.....	84
5.1.2. YÜZEY MOLEKÜL ANALİZİ BULGULARI.....	86
5.1.3. FARKLILAŞMA ANALİZİ BULGULARI.....	88
5.2. RNA İZOLASYONUNA AİT BULGULAR.....	91
5.3. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİNE AİT BULGULAR.....	92
5.3.1. NORMALİZASYON ÖNCESİ VE NORMALİZASYON SONRASI BULGULAR	92
5.3.2. GRUPLAR ARASINDA FARKLILIK GÖSTEREN MİRNA'LAR.....	94
5.3.2.1. AML-SK Arasında Farklılık Gösteren MiRNA'lar.....	95
5.3.2.2. MDS-SK Arasında Farklılık Gösteren MiRNA'lar.....	96
5.3.2.3. AML-MDS Arasında Farklılık Gösteren MiRNA'lar.....	97
5.3.2.4. KÜMELEME ANALİZİ SONUÇLARI.....	98

5.4. MİRNA'LARIN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASINA AİT BULGULAR	100
5.5. MİRNA HEDEF GENLERİNİN TESPİTİNE AİT BULGULAR.....	103
5.6. MİRNA HEDEF GENLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLMİŞ YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR.....	104
5.6.1. AML-SK YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR.....	104
5.6.2. MDS-SK YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR.....	104
5.6.3. AML-MDS YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR	107
5.7. MİRNA HEDEF GENLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASINA AİT BULGULAR	109
5.8. DICER1 GENİNİN İFADE ANALİZİNE AİT BULGULAR.....	112
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	113
6.1. TARTIŞMA.....	113
6.1.1. MDS MKH MİRNA PROFİLLERİNİN SK MKH MİRNA PROFİLLERİ İLE KİYASLANMASI.....	117
6.1.2. AML MKH MİRNA PROFİLLERİNİN SK MKH MİRNA PROFİLLERİ İLE KİYASLANMASI.....	119
6.1.3. MDS MKH MİRNA PROFİLLERİNİN AML MKH MİRNA PROFİLLERİ İLE KİYASLANMASI.....	120
6.2. SONUÇ.....	129
7. KAYNAKLAR	131
8. EKLER	166
9. ÖZGEÇMİŞ	169
10. TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR.....	170

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hematopoetik hücrelerin hiyerarşisi	6
Şekil 2.2. MDS'deki en yaygın sitogenetik anomalilerin frekansı.....	16
Şekil 2.3. İğ şeklinde ve fibroblast benzeri insan MKH'leri.....	36
Şekil 2.4. MKH'lerin farklılaşma potansiyeli	37
Şekil 2.5. Kemikteki endosteal ve perivasküler HKH nişi	44
Şekil 2.6. miRNA biyogenez basamakları ve etki mekanizması.....	55
Şekil 2.7. Hematopoetik gelişimde miRNA'ların rolü.....	58
Şekil 5.1. Kültür edilmiş MDS/AML ve sağlıklı kontrol kemik iliği MKH'lerinin mikroskop altındaki görüntüsü (4X ve 10X Büyütme)	85
Şekil 5.2. Hasta ve sağlıklı kontrol MKH'lerinin akım sitometri ile karakterizasyonu	87
Şekil 5.3. Osteojenik ve adipojenik farklılaşma gösteren sağlıklı kontrol, AML ve MDS MKH'lerinin mikroskop görüntüleri (4X ve 10X büyütme).....	89
Şekil 5.4. Hasta ve sağlıklı kontrollerin kantitatif osteojenik farklılaşma sonuçlarını gösteren sütun grafiği	90
Şekil 5.5. Hasta ve sağlıklı kontrollerin kantitatif adipojenik farklılaşma sonuçlarını gösteren sütun grafiği	90
Şekil 5.6. İzole edilen total RNA'ların temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	92
Şekil 5.7. Çiplere ait verilerin normalizasyon öncesi sinyal verilerinin kutu grafiği.....	93
Şekil 5.8. Çiplere ait verilerin normalizasyon sonrası sinyal verilerinin kutu grafiği.....	94
Şekil 5.9. Analiz sonucunda AML ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği	96

Şekil 5.10. Analiz sonucunda MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği	97
Şekil 5.11. Analiz sonucunda AML ve MDS örnekler arasında anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği.....	98
Şekil 5.12. Sınıf karşılaştırması sonucunda AML ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı değişiklik gösteren ($p<0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait temsili heatmap	99
Şekil 5.13. Sınıf karşılaştırması sonucunda MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı değişiklik gösteren ($p<0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait temsili heatmap	99
Şekil 5.14. Sınıf karşılaştırması sonucunda AML ve MDS arasında anlamlı değişiklik gösteren ($p<0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait temsili heatmap.....	100
Şekil 5.15. AML ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=20).....	101
Şekil 5.16. MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=19; ** $p<0,01$, * $p<0,05$)	102
Şekil 5.17. MDS ve AML hasta örnekleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=23; ** $p<0,01$, * $p<0,05$).....	103
Şekil 5.18. AML ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen BDNF (hsa-miR-134-5p'nin hedefi) geninin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=21) ..	110
Şekil 5.19. MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen RUNX1 (hsa-miR-30d-5p'nin hedefi) ve MYC (hsa-miR-30a-3p'nin hedefi) geninin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=16).....	111

Şekil 5.20. MDS ve AML örnekleri ile gerçekleştirilen CALM3 (hsa-miR-4646-3p'nin hedefi), BCR (hsa-miR-4436b-5p'nin hedefi), IKBKB (hsa-miR-324-3p'nin hedefi) ve CASP3 (hsa-miR-4436b-5p'nin hedefi) genlerinin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=21; * p<0.05, ** p<0.01.).....	111
Şekil 5.21. MDS/ AML ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen DICER1 geninin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=29; p<0.001)	112
Şekil 6.1. AML sinyal yolağının KEGG görüntüsü	118
Şekil 6.2. Kanserde yer alan sinyal yolaklarının KEGG görüntüsü	119
Şekil 6.3. MAPK sinyal yolağının KEGG görüntüsü.....	120
Şekil 6.4. p53 sinyal yolağının KEGG görüntüsü	121

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Miyelodisplastik sendromlar için FAB sınıflama kriterleri	9
Çizelge 2.2. WHO (2008) MDS sınıflaması	11
Çizelge 2.3. Uluslararası prognostik puanlama sistemi (IPSS).....	12
Çizelge 2.4. IPSS'e göre genel sağkalım ve lösemiye dönüşüm olasılığı.....	13
Çizelge 2.5. AML'de FAB sınıflaması.....	23
Çizelge 2.6. AML'de WHO sınıflaması.....	24
Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen örneklere ait bilgiler.....	71
Çizelge 4.2. miRNA primerleri	73
Çizelge 4.3. mRNA primerleri	74
Çizelge 5.1. Farklılaşma analizi yapılabilen bazı örneklerin kantitatif ölçüm sonuçları. ...	88
Çizelge 5.2. RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri	91
Çizelge 5.3. AML hastalarının sağlıklı kontroller ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar	95
Çizelge 5.4. MDS hastalarının sağlıklı kontroller ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar	96
Çizelge 5.5. AML hastalarının MDS hastaları ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar	97
Çizelge 5.6. Tahmini miRNA hedef gen sayıları	103
Çizelge 5.7. AML'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi artan hsa-miR-134- 5p'ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	104

Çizelge 5.8. MDS’li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi azalan hsa-miR-222-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	104
Çizelge 5.9. MDS’li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi azalan hsa-miR-30a-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	106
Çizelge 5.10. MDS’li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi azalan hsa-miR-30d-5p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	106
Çizelge 5.11. AML’li hastalarda MDS’li hastalara göre ifadesi artan hsa-miR-324-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	107
Çizelge 5.12. AML’li hastalarda MDS’li hastalara göre ifadesi artan hsa-miR-4436b-5p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	108
Çizelge 5.13. AML’li hastalarda MDS’li hastalara göre ifadesi artan hsa-miR-4646-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	109

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
AML	Akut Miyeloid Lösemi
bFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
CFU-F	Koloni oluşturan birim fibroblast
CFU-S	Koloni oluşturan ünite dalak
CO ₂	Karbondioksit
ddH ₂ O	Deiyonize su
DMSO	Dimetilsülfoksit
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
HGF	Hepatik büyüme faktörü
HKH	Hematopoetik kök hücreler
IFN-γ	İnterferon gama
IPSS	Uluslararası prognostik puanlama sistemi
LIF	Lösemi inhibitör faktör
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
miRNA	MikroRNA
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
MNH	Mononükleer hücre

mRNA	Mesajcı RNA
nm	Nanometre
PBS	Fosfat tamponlu tuzu
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
TBE	Tris-borat-EDTA
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü beta
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	Dünya sağlık örgütü
WPSS	Dünya sağlık örgütüne dayanan prognostik skorlama sistemi
μ l	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Miyelodisplastik sendrom (MDS), kan hücrelerinin yetersiz üretimi ve displazisi ile karakterize bir klonal kök hücre hastalığıdır. En önemli klinik özelliği, birlikte veya tek başına görülebilen anemi, lökopeni ve trombositopeni oluşturmalarıdır. Kronik ve asemptomatik sitopeniler ile seyredebileceği gibi semptomatik anemi, enfeksiyon ve kanama ile de kendini gösterebilir, ayrıca akut lösemiye dönüşebilir. Sıklıkla ileri yaşların hastalığıdır (1).

MDS hastalarında hematopoetik bozukluğa neden olan mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. Genetik anormallik kazanımına yol açan genetik kararsızlığa yatkınlığın ve klonal hematopoezin MDS'de önemli rolü olduğu görülmüştür (2). Fakat anormal kemik iliği mikroçevresi tarafından hematopoezin yetersiz desteklenmesinin de MDS'de hematopoetik bozukluğa katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (3). Anormal hematopoetik-stromal hücre etkileşimleri, aktifleşen klonların sağladığı lenfositlerin varlığı, normal ve klonal kemik iliği alt popülasyonlarını etkileyen makrofajlar, hematopoetik büyüme faktörlerinin göreceli eksikliği ve inhibitörlerin anormal salınımı MDS'de rapor edilmektedir. Büyümeyi engelleyen sitokinler arasında tümör nekroz faktör (TNF)- α , interlökin (IL)-1 β , interferon (IFN)- γ , TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ve TGF- β 1, MDS hastalarında kemik iliği hematopoetik hücrelerinin apoptotik sürecinde ilişkilidir (4-6). Sitokin, kemokin ve çözünen faktörlerin büyük bir çoğunluğu kemik iliğinde stromal bileşeni oluşturan MKH'ler tarafından salgılanmaktadır.

Akut Miyeloid Lösemi (AML) kök hücre veya progenitör hücrelerde kontrolsüz büyümeye yol açan genetik anormallikler serisinden meydana gelir (7). AML biyolojisi karmaşıktır ve patolojik şartlar hematopoetik hücrelerin bir anormal klonundan daha çoğunu kapsamaktadır. Yetersiz hematopoez, hematopoetik hücre ve hematopoetik mikroçevre arasındaki karmaşık etkileşimden meydana gelmektedir (8,9). Geçen yıllardan elde edilen veriler hematolojik malignitelerin patogenezinde hematopoetik mikroçevrenin ilişkisinin olduğunu göstermektedir (7).

Hematopoetik kök hücreler (HKH) niş olarak da bilinen oldukça özelleşmiş karmaşık mikroçevrede bulunurlar (10,11). Hematopoetik mikroçevre, ekstraselüler matriks yanısıra

normal hematopoezi desteklemede birlikte iş gören çözünür ve membran bağ faktörleri gibi hematopoetik olmayan ve hematopoetik hücrelerin karmaşık yapısından oluşmaktadır. Hematopoetik mikroçevrenin ana bileşeni mezenkimal stromal hücrelerdir. Son zamanlarda mezenkimal kök hücre (MKH) olarak tanımlanan plastiğe yapışabilen bu hücreler multipotent mezenkimal stromal hücreler olarak tanımlanmıştır (12). MKH'ler mezodermal germ tabakasından meydana gelen primitif hücrelerdir ve bu hücrelerin bağ dokusuna, iskelet kas dokusuna ve vasküler sistem hücrelerine dönüşebildiği bildirilmiştir. Friedenstein ve arkadaşları MKH'leri (1974) kültürde plastiğe yapışmayla kemik iliğinden izole edilebilen fibroblast benzeri hücreler olarak ilk tanımlayanlardır. Friedenstein MKH'leri koloni oluşturan birim fibroblast (CFU-F) olarak kültür şartlarında iğ şeklinde klonogenik multipotansiyel stromal öncül hücrelerin popülasyonu olarak tanımlamıştır (13). MKH'ler mezenkimal ve mezenkimal olmayan hücre serilerine farklılaşabilen hematopoetik olmayan multipotansiyel kök hücrelerdir (14). Bu hücreler *in vitro* ve *in vivo* koşullarda adipositlere, kondrositlere, osteositlere ve miyoblastlara farklılaşabilmektedir (15-17). Kemik iliği mikroçevresinin hematopoezi esas destekleyen hücresel elementleri olan adipositler, osteoblastlar ve fibroblastlar MKH'lerden meydana gelmektedir (15). Dolayısıyla hematopoetik mikroçevrenin ana bileşeni kemik iliği MKH'leridir. MKH'ler hematopoetik mikroçevrenin başlıca bileşeni olarak hematopoezi desteklemede önemli rol oynarlar (18).

MDS/AML gibi hematolojik hastalıklarda kemik iliği mikroçevresi hücrelerinin herhangi birinin sayı veya fonksiyonundaki değişikliklerin kemik iliği mikroçevresini oluşturan diğer hücrelerin fonksiyonu ve sayısını değiştirerek, böylece hematopoezin düzenlenmesinin bozulması sonucu geliştiği çeşitli araştırmalarda belirtilmektedir. Bu nedenle MDS/AML gibi hastalıklarda kemik iliği mikroçevresinin dengesi değişmektedir ve kemik iliği mikroçevresinin başlıca bileşeni MKH olduğundan bu hastalıklarda MKH anormalliklerinin bulunabileceği gözönünde bulundurulmalıdır. MKH anormalliklerinin hematolojik hastalıklar üzerinde etkili olup olmadığı ve varsa böyle değişikliklerin hastalık gelişimine, hastalığın seyrine nasıl katkıda bulunduğu tartışmalı kalmıştır.

MikroRNA'lar (miRNA) yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda tek iplikli RNA molekülüdür ve gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. miRNA'lar kodlamayan

RNA'lardandır, yani DNA'dan transkripsiyonu yapılan ama proteine çevirisi yapılmayan genler tarafından kodlanırlar. DICER1, miRNA biyogenezi için gerekli olan enzimdir. DICER1, mikroRNA olgunlaşmasının düzenlenmesiyle embriyonik gelişme, hücre büyümesi ve fenotip farklılaşması gibi çok geniş aralıktaki fizyolojik süreçlerde kritik rol oynar. Yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar miRNA'ların kök hücre farklılaşmasında, MKH'lerden salgılanan sitokinlerin ifadelerinin düzenlenmesinde, hematopoezde önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Bu veriler hematopoetik niş üzerinde bu miRNA'ların önemli düzenleyici rolünün olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada MDS ve AML hastalarında kemik iliği kökenli MKH'lerin rolünü araştırmak üzere DICER-1 geni ve miRNA ifadeleri incelenmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada miRNA biyogenezi için gerekli bir RNaz III endonükleaz olan DICER-1 gen delesyonunun osteoprogenitör hücrelerde fonksiyon bozukluğuna neden olup mikroçevreyi bozarak perifer kan sitopeni, miyelodisplazi ve sekonder lösemiye yol açtığı tespit edilmiştir (19). Osteoprogenitör hücreler MKH'lerden köken aldıkları için MKH'lerde miRNA ifade analizleri ve DICER1 geninin ifade analiziyle MDS ve AML'deki MKH'lerde moleküler anormallikler araştırılmıştır. Bu çalışmada DICER-1 geninin ve ifadesinde önemli değişiklikler tespit edilen miRNA'ların, bu miRNA'ların hedefledikleri genlerin hastalık patogenezindeki katkısı ve kemik iliği mikroçevresindeki düzenleyici rollerinin anlaşılması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. HEMATOPOEZ

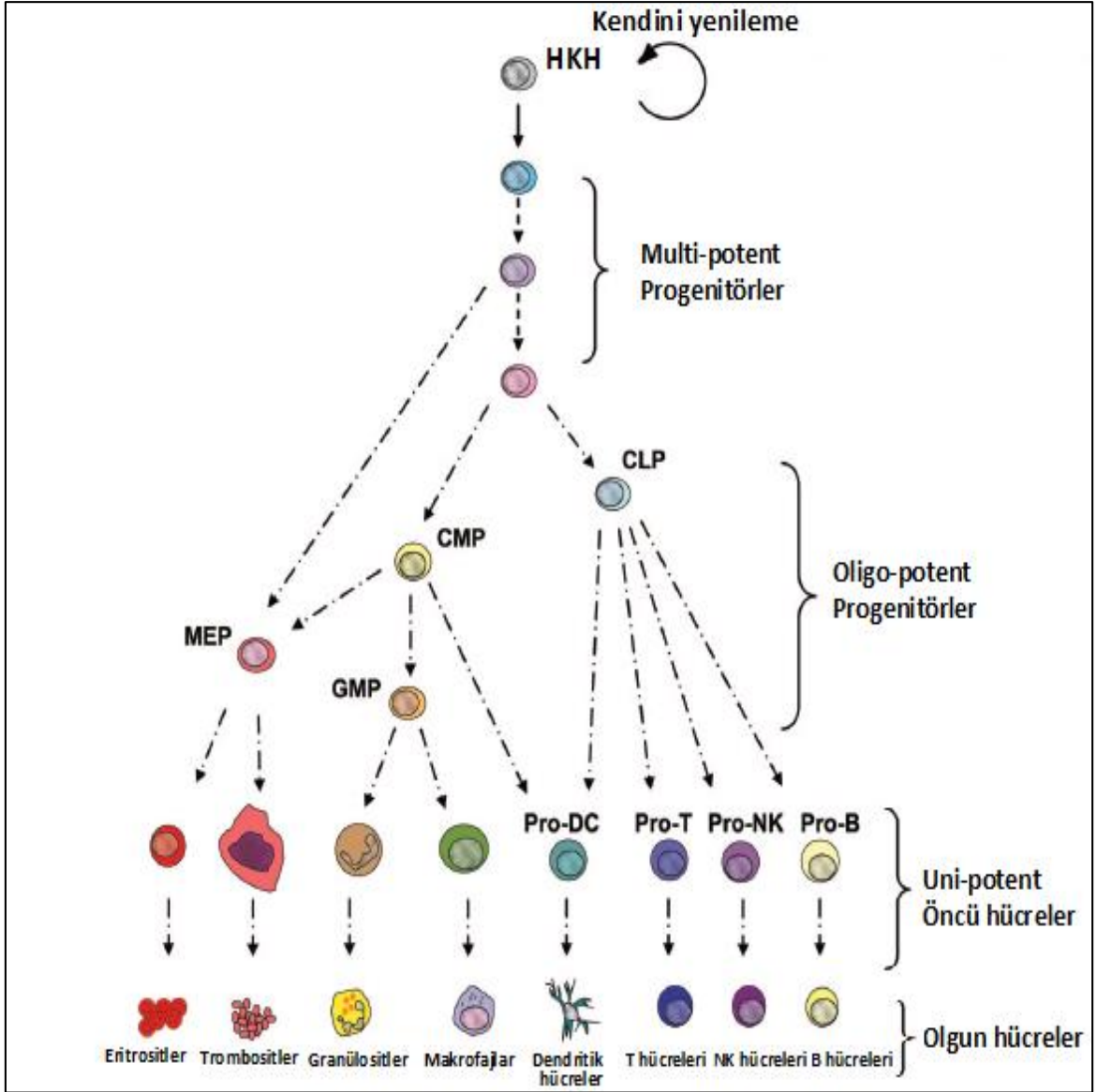
İnsan vücudu her gün hastalık veya travma yanısıra normal hücre döngü süreçlerinde yok olan kan hücrelerini yenilemek için milyarlarca yeni beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve trombositleri üretir. Çeşitli homeostatik mekanizmalar kanama veya infeksiyon gibi streslere hızlıca yanıt vermek için kan hücresi üretimine olanak sağlar ve daha sonra stres ortadan kalktığında kan hücresi üretimi normal düzeylere geri döner. Kan hücresi üretiminin ve homeostazın son derece organize süreci “hematopoez” olarak adlandırılır (20). Hematopoez kırmızı kan hücreleri (eritrositler) beyaz kan hücreleri (lökositler) ve trombositleri içeren yeni kan hücreleri oluşumunun karmaşık gelişimsel sürecidir (21,22). Her gün hematopoez ile yaklaşık olarak 175 milyar kırmızı kan hücreleri, 70 milyar granüosit (nötrofiller, eozinofiller, bazofiller) ve 175 milyar trombosit üretilir. Eğer ihtiyaç duyulursa üretim 5-10 kat artırılabilir (21,22).

Olgun kan hücreleri ağırlıklı olarak kısa ömürlü olduğu için yaşam boyu çoklu dizinli progenitörleri ve bireysel hematopoetik serilere yönlendirilen öncülleri yenilemek için kök hücrelere gereksinim vardır. HKH'ler erişkin memelilerdeki kemik iliğinde seyrek olarak bulunur ve giderek birkaç veya tek seriye kısıtlanan progenitör hiyerarşisinin üstündedir (23). Bu progenitörler kırmızı kan hücreleri, megakaryositler, miyeloid hücreler (monosit/makrofaj ve nötrofil) ve lenfositler gibi olgun kan hücrelerinin üretimini sağlayan kan öncüllerini verir. Tüm diğer kök hücreleri gibi HKH'ler de kendi kopyasını yapabilmekte ve farklılaşabilmektedirler (özellikle tüm kan hücre serilerine) (24).

HKH ve son olarak farklılaşan hücreler arasında bölünebilen ve belirli serilere ilerleyebilen, belirli uyarılara bağlı, farklı aşamalardaki progenitörler bütünü vardır (Şekil 2.1) (25,26). Gerçekten giderek geliştirilen kültür yöntemleri sayesinde kök hücreleri ve progenitör hücreleri en ilkelden en olgun olana doğru ayırt etme imkanı ortaya çıkmıştır. Buna göre en ilkelden olguna doğru geldikçe hücrelerin çoğalma kapasiteleri giderek azalmakta, bununla ters orantılı bir şekilde farklılaşmaları artmaktadır. Doğal olarak daha olgun basamaklara gelindikçe logaritmik olarak bu özellikleri taşıyan hücrelerin sayısı artmaktadır (27).

Genellikle hematopoetik gelişimin erken bir aşamada miyeloid ve lenfoid dallara ayrıldığına inanılmaktadır. Lenfoid dalı B, T ve doğal öldürücü hücreleri oluştururken miyeloid dalı eritrositler gibi diğer hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Aslında ortak lenfoid progenitörler ve ortak miyeloid progenitörler olarak adlandırılan lenfoid veya miyeloid potansiyelli iki farklı progenitör popülasyonu fare kemik iliğinden izole edilmiştir (25,26). Böylece çok az sayıdaki gerçek kök hücreden gerçekte kesintisiz bir dönüşümle daha fazla sayıdaki progenitör hücrelere, onlardan da kemik iliği aspiratlarında morfolojik olarak tanımlanabilir öncüller olan prekürsör hücrelere dönüşüm gerçekleşmiş olur. En sonunda öncüllerden olgunlaşan bildiğimiz kan hücreleri ortaya çıkar. Kök hücrelerden progenitör hücreler ve onlardan da en sonunda tanınabilir olgun hücrelerin oluşmasında karmaşık ve tam anlaşılmamış kontrol mekanizmaları rol oynar. Başlangıçta lokal kontrol mekanizmalarının baskın olarak rol oynadığı ve olgunlaşma ilerledikçe bunun yerine kademe kademe humoral düzenlemenin daha etkili olmaya başladığı söylenebilir (27).

Hematopoez süreci kan hücreleri ve çevreleri arasındaki karmaşık etkileşimi gerektirir. Bu etkileşim HKH'lerin, progenitörlerin ve olgunlaşan kan hücrelerinin sessiz kalıp kalmamasını, çoğalıp çoğalmamasını, farklılaşp farklılaşmasını, kendini yenilemesi veya kendini yenilememesini veya apoptoz geçirip geçirmemesini belirler (24,28,29). Kan üretimini yöneten genetik ve çevresel mekanizmaların tümü bu temel hücresel süreçlerin göreceli dengesini etkileyerek çalışır. Normal şartlar altında HKH'lerin ve progenitörlerin çoğu hücre döngüsünün G0 fazında sessizdir, fakat progenitörlerin çoğu çoğalmakta ve olgun ürün üretmektedir (30). Herhangi bir stres yokluğunda, bu durum progenitörlerde ve olgun hücrelerde apoptoz oranıyla dengelenir (29). Kanama veya enfeksiyon gibi stres durumunda birkaç süreç oluşur. Kemik iliğine veya endotelyuma yapışan hücreler hızlıca hasar bölgesine ulaşmak için dolaşıma salınır (31). Ek olarak sessiz progenitörler ve HKH'ler çoğalmak ve olgun beyaz hücrelere, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere farklılaşmak için çeşitli büyüme faktörleriyle uyarılır. Kanama, enfeksiyon, altta yatan diğer stres durumu ortadan kalktığında ve kan hücrelerine olan ihtiyaç normale döndüğünde kan hücreleri depolandıkları bölgelere geri dağılırlar ve hematopoez başlangıç seviyesine geri döner. Bu süreç bireyin yaşam süresi boyunca sayısız kez kendini tekrarlar.



Şekil 2.1. Hematopoetik hücrelerin hiyerarşisi. Hiyerarşinin en üstündeki kendini yenileyen HKH'ler multipotent progenitörleri oluşturmaktadır. Multipotent progenitörler olgun B lenfositlerini, T lenfositlerini ve NK hücrelerini oluşturan CLP gibi oligopotent progenitörleri oluşturmaktadır. CMP, monosit/makrofaj ve granüositlere farklılaşan GMP ve megakaryosit/trombosit ve eritrositlere farklılaşan MEP'ni vermektedir. CMP ve CLP'lerin dendritik hücreleri oluşturduğu öne sürülmektedir. CMP, ortak miyeloid progenitör; CLP, ortak lenfoid progenitör; MEP, megakaryosit/eritrosit progenitörleri; GMP, granüosit/makrofaj progenitörleri (32).

2.2. MİYELODİSPLASTİK SENDROM (MDS)

2.2.1. TANIM VE TARİHÇE

Miyelodisplastik sendrom (MDS) kemik iliği yetersizliği, perifer kan sitopenileri, morfolojik displaziler, kontrolsüz çoğalma, yetersiz hematopoetik farklılaşma ve AML'ye transformasyon riski yüksek olmasıyla karakterize edilen hematolojik bozuklukların heterojen klonal kök hücre hastalıkları grubunu oluşturmaktadır (33).

Hastalık 19. yüzyıl başından itibaren tarif edilmeye başlamıştır. İlk kez 1907 yılında Luzatto ve arkadaşları (34) aplastik anemiye benzeyen, ancak kemik iliğinde eritroid hiperplazi saptanılan bir hasta için pseudo-aplastik anemi tanımını kullanmıştır. 1982 yılına kadar hastalığı tanımlamada bir kavram kargaşası devam etmiştir. Bu tarihe kadar multipl refrakter sitopeni ve morfolojik olarak kemik iliği displazisi bulunan hastalarda altta yatan patolojiyi tanımlamak için; miyelodisplastik ya da dismiyelopoetik sendrom, prelösemi, oligolösemi, refrakter anemi, smoldering lösemi gibi subakut ya da yavaş seyirli lösemi gibi çeşitli terimler kullanılmıştır (35). Bu tarihte Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) çalışma gurubu tarafından MDS ve alt gurupları tanımlanmıştır (36). FAB sınıflandırması 15 yıl süre ile hekimlere bir kılavuz olmuştur. 1997 yılında hastalık için klinik, morfolojik ve sitogenetik özellikler temel alınarak uluslararası prognoz skorlama sistemi önerilmiştir (37). 1997 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ; World Health Organization, WHO) MDS'yi farklı şekilde sınıflandırmıştır (38).

2.2.2. EPİDEMİYOLOJİ

MDS tipik olarak ileri yaşlarda tanı alır, ayrıca klinisyenler tedavi ile ilişkili MDS (t-MDS) ihtimalinin de farkında olmalıdır. Mevcut veriler MDS'nin ağırlıklı olarak bir yaşlılık hastalığı olduğunu göstermektedir. MDS'li hastaların %80'den fazlası 60 yaşın üzerindedir. MDS 50 yaşın altında nadir görülür. Vakaların sadece %6'sı 50 yaş ve daha küçük bireylerde tanı almıştır (1,39). Ancak yaşın ilerlemesiyle prevalans hızla artar. Ortalama görülme yaşı 70'tir. 50 yaşın altındaki hastalarda insidans 0.5/100000 iken, 70 yaşın üzerinde 45/100000'den fazladır (1).

2.2.3. SINIFLANDIRMA

MDS değişik derecelerde anemi, lökopeni ve trombositopeni ile seyreden, hastalarda transfüzyon ihtiyacına yol açan veya enfeksiyon ya da kanamaya duyarlı hale getiren bir çeşit kemik iliği yetmezliği sendromlarından oluşur. 1974-1975 yılları arasında FAB çalışma grubu olarak adlandırılan hematolog ve patoloğlardan oluşan bir grup, akut lösemilerin sınıflandırması için ilk sistematik terminolojiyi geliştirmiştir (40). 1976 raporunda (41) FAB grubu dismiyelopoetik sendromun 2 geniş kategorisini (Blast Artışlı Refrakter Anemi ve Kronik Miyelomonositik Lösemi) tanımlamıştır. 1982'de FAB grubu MDS'nin son FAB sınıflandırmasını oluşturmak üzere bu şemayı yenilemiştir (36). Blast yüzdesine, ring sideroblastların ve/veya monositlerin tanımlanmasına dayanarak FAB, MDS'nin 5 morfolojik alttipini tanımlamıştır. FAB sınıflaması MDS'nin anemik değişiklikleri yanısıra lösemik bileşenlerini de kapsamaktadır (Çizelge 2.1) (36). Bu sınıflamada, akut lösemi tanısı için kemik iliği ya da periferik kanda %30'dan fazla miyeloblast bulunması gerekmektedir. %30 veya daha az miyeloblast bulunan hastalar MDS olarak sınıflandırılmıştır. İlk iki kategori olan RA ve RARS, kemik iliğinde %5'ten az miyeloblast bulunmasıyla karakterizedir. RA ve RARS'lı hastalarda ortalama sağkalım daha uzundur ve diğer kategorilere göre akut lösemiye ilerleme daha düşük oranlardadır. RAEB ve RAEB-T'li hastaların kemik iliğinde sırasıyla %5-20 ile %21-30 miyeloblast bulunmaktadır. Bu hastalarda sıklıkla daha ağır sitopeni vardır, akut lösemiye ilerleme riski artmıştır ve ortalama sağkalım daha kısadır. KMML'li hastalar heterojen bir gruptur. Bazı hastalarda belirgin pansitopeni ve kemik iliğinde üç seride de displazi yanısıra bazılarında ise artmış beyaz küre sayısı, periferik monositoz, splenomegali ve hipermetabolik semptomların olduğu miyeloproliferatif hastalık tablosu izlenebilir. FAB sınıflandırmasından genel bir prognostik gösterge olarak faydalanılmasının yanında bu sınıflandırma miyelodisplazilerin tanımlanmasında önemli bir gelişme sağlamıştır.

Çizelge 2.1. Miyelodisplastik sendromlar için FAB sınıflama kriterleri (36).

Alt Grup	Kısaca	Periferik Kan	Kemik İliği
Refrakter Anemi	RA	Blast < % 1	Blast < % 5
Ring Sideroblastli Refrakter Anemi	RARS	Blast < % 1	Blast < % 5, Ring Sideroblast > % 15
Blast Artışlı Refrakter Anemi	RAEB	Blast < % 5	Blast % 5-20
Transformasyonda Blast Artışlı Refrakter Anemi	RAEB-T	Blast > % 5	Blast % 21-30 ya da Auer Rod
Kronik Miyelomonositik Lösemi	KMML	Monosit > 1000/mm ³	Herhangi biri
Akut Miyeloid Lösemi	AML		Blast > % 30

MDS’de FAB sınıflaması zamanla önemli kısıtlamalara yol açmıştır. Zamanla sitogenetik, immünolojik ve moleküler alandaki gelişmeler ve ayrıca “hipoplastik MDS” ve “fibrozisli MDS” gibi farklı morfolojik alt tiplerin tanımlanması (42) ve tedaviye ikincil MDS’lere ayrı bir yer verilmemesi ile bu sınıflama yetersiz kalmaya başlamıştır. RAEB, RAEB-T ve AML benzer biyolojik süreçleri göstermektedir. MDS ile akut lösemi ayırımında kullanılan kemik iliğindeki %30’luk miyeloblast oranı biyolojik olarak uyumsuzdur ve sıklıkla tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde karışıklığa yol açmaktadır. Bu nedenle WHO sınıflama şeması geliştirilmiştir. 2008’de WHO sınıflandırması morfoloji, sitopeni, blast sayısı ve sitogenetiğe dayalı 6 erişkin ve 1 çocuk MDS kategorisi tanımlamıştır: 1) Refrakter anemi (RA), refraktör nötropeni (RN) ve refraktör trombositopeni (RT) içeren tek dizeli displazili refraktör sitopeni (RCUD), 2) halka sideroblastlı refrakter anemi (RARS), 3) çoklu dizide displazili refrakter sitopeni (RCMD), 4) artmış blastlı refrakter anemi-1 (RAEB-1), 5) artmış blastlı refrakter anemi-2 (RAEB-2), 6) sınıflandırılmayan MDS (MDS-U) ve 7) iyi prognoz grubu olarak izole del 5q ile ilişkili MDS (Çizelge 2.2).

Klinik olarak MDS aynı zamanda *de novo* ve sekonder/terapi ilişkili olmak üzere ikiye ayrılabilir. Son WHO sınıflandırması MDS teşhisini kolaylaştırmada mutasyonların varlığını dikkate almamaktadır. Sadece spesifik bir WHO MDS sınıflandırmasıyla ilişkili olan tek sitogenetik bulgu izole del 5q’dur.

Yeni WHO sınıflamasında AML miyeloblast sayısının %20 ve daha fazla olması şeklinde tanımlanır ve RAEB-T kategorisi bulunmaz (Çizelge 2.2) (38). Ayrıca RA ve RAEB-T grubunda yer alan hastaların en azından prognostik davranışlarında farklılıklar da

belirlenmiştir. Refrakter anemi tanılı hastaların yalnız eritropoetik displaziye sahip olanları ile daha kötü prognoza sahip çok dizeli displazi gösterenlerin farklı seyirleri nedeniyle ayrılabilceğı belirtilmiştir. Benzer şekilde bir alttipleme RAEB-T grubu hastalar için de öngörülerek hem blast sayıları hem de Auer cisimlerinin varlığına göre yapılmıştır (Çizelge 2.2). Bunlara ilaveten Auer cisimciklerinin mutlaka kötü prognoz ile birlikte olmayabileceğı ya da lösemik transformasyon için tüm miyeloblast oranından daha fazla belirleyici olmadığı, prognostik anlamının tekrar incelenmesi gerektiğı gibi bazı itirazlar da gelişmiştir (43). Bu ve benzeri arayışlardan dolayı WHO, FAB sınıflama sistemine bazı eklemeler yapmıştır (43-45). Bu düzenlemede RAEB, ilik blast sayısı temelinde RAEB-I (<5-10) ve RAEB-II (11-20) olarak iki alt gruba ayrılmış ve RAEB-T olarak tanımlanan 20-30 ilik blastına sahip tip ise AML olarak sınıflandırılmıştır (44,45). Eski FAB sınıflamasında MDS başlığı altında ele alınan KMML kategorisi de problemlidir. Yeni WHO sınıflamasıyla KMML, MDS kategorisinden çıkarılmış ve miyeloproliferatif hastalıklar grubuna alınmıştır. Bu değişiklik sadece klinik değerlendirme açısından değil aynı zamanda KMML'li hastalar için gereken çoğu tedavi seçimleri açısından da daha uygundur.

Sonuçta WHO sınıflamasında RAEB'in 2 alt kısma ayrılması ve RAEB-T'nin AML olarak tanımlanması (46,47), KMML gruplaması onay bulurken bu sistemin de tamamen morfolojik temelde displazi tanımı ile yapılan alt tipler ve hipoplazik ilikli MDS'yi içermemesi tartışmalara açık kalmıştır (48).

Çizelge 2.2. WHO (2008) MDS sınıflaması (49).

Altıtip	Çevre Kamı	Kemik İliği
Tek dizide displazi ile seyreden refrakter sitopeniler (RCUD) Refrakter anemi (RA) Refrakter nötropeni (RN) Refrakter trombositopeni (RT)	Tek veya iki dizide sitopeni I Blast nadir veya yok (<% 1)	Tek dizide displazi; Etkilenen dizide \geq % 10 displazi Blast<% 5 Halka sideroblast<% 15
Halka sideroblastlı refrakter anemi (RARS)	Anemi var Blast yok	Sadece eritroid displazi Halka sideroblast \geq % 15
Çoklu dizide displazili refrakter sitopeni (RCMD)	Sitopeni (Ier) Blast<% 12 Auer cisimciği yok Monosit<1000/mm ³	\geq 2 miyeloid dizide (nötrofil ve/ veya eritroid öncül ve/veya megakaryosit) \geq % 10 displazi Blast<% 5 Auer cisimciği yok \pm % 15 halka sideroblast
Artmış blastlı refrakter anemi-I (RAEB-I)	Sitopeni (Ier) Blast<% 5 Auer cisimciği yok Monosit<1000/mm ³	Tek veya çok dizide displazi % 5-9 blast ² Auer cisimciği yok
Artmış blastlı refrakter anemi-II (RAEB-II)	Sitopeni (Ier) Blast<% 5-19 Auer cisimciği \pm 3 Monosit<1000/mm ³	Tek veya çok dizide displazi % 10-19 blast Auer cisimciği \pm
Sınıflanmamış MDS (MDS-U)	Sitopeniler Blast \leq % 12	Bir veya daha fazla miyeloid hücre dizisinde <% 10 displazi Blast<% 5 ²
İzole del 5q	Anemi Normal/artmış trombosit sayısı Blast<% 1	Çekirdeği az lobüllü normalsa veya artmış megakaryosit Blast<% 5 Sitogenetik olarak izole del 5q Auer cisimciği yok

2.2.4. PROGNOZ

Uluslararası Miyelodisplastik Sendrom Risk Analizi çalışmasında 800'den fazla hasta üzerinde yapılan analizlerle yeni tanı almış MDS hastalarının prognozunu belirlemek için

Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (IPSS=International Prognostic Scoring System) kullanılmaktadır (Çizelge 2.3 ve 2.4) (50). IPSS en geniş kabul gören ve kullanım alanı bulan skorlama sistemidir. IPSS hastaları sağkalım sonucuna ve AML'ye ilerleme riskine dayanan farklı altgruplara ayırmak için prognoz üzerinde en önemli değişkenler olarak kemik iliği miyeloblast yüzdesi, spesifik sitogenetik anormallikleri ve sitopeni derece ve sayısını kullanmaktadır (Çizelge 2.3) (37). Sitogenetik özellikler ortalama sağkalım üzerinde güçlü etkiye sahiptir (37,51). Klonal sitogenetik anormallikler tüm hastaların yaklaşık olarak %50'sinde bulunmaktadır ve teşhiste yardımcı olmasının yanısıra FAB ve WHO sınıflandırma sistemleriyle birlikte kullanıldığında prognozun göstergesi olabilir (52). Doğru prognozu saptamak için hastanın sitogenetiği hakkında bilgi edinmek önemlidir. Ek olarak tespit edilen sitogenetik risk faktörlerinden bağımsız olarak bazı genetik mutasyonların MDS'li hastalarda kötü sağkalım sonucunun öngörücüsü olduğu bulunmuştur (53). Ayrıca prognozun kemik iliğindeki miyeloblast sayısı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir. Diğer kötü prognostik özellikler ise yaşın 60'tan yüksek olması ve erkek cinsiyettir. Yaşın etkisi ise tartışmalıdır ama yine de yaşla ilişkili gruplamaların sağkalım değerlendirilmesinde önemine işaret edilmektedir (37,51). Bu veriler kullanılarak oluşturulan puanlama sistemi ile hastalar düşük risk, orta-1, orta-2 ve yüksek risk olarak ayrılan dört risk safhasından (Çizelge 2.4) birine girmektedir (50,54,55). Bu safhalara göre hastaların %25'inin AML'ye ilerlemesi için belirlenen zaman ve sağkalım sürelerini değerlendiren çalışmalar da bulunmaktadır (Çizelge 2.4) (37,48,54). Medyan sağkalım IPSS'nin tanımladığı yüksek riskli hastalarda 0,4 yıldan, düşük riskli hastalarda 5,7 yıla kadar değişmektedir (Çizelge 2.4) (37). Hastaların yaklaşık %25-30 kadarı zaman dilimleri değişik de olsa sonuçta AML'ye ilerlemekte ve lösemi ile kaybedilmektedir (56).

Çizelge 2.3. Uluslararası prognostik puanlama sistemi (IPSS) (37).

Prognostik değişken	Puan değeri				
	0	0.5	1	1.5	2
Kemik iliği blast(%)	<5	5-10	-	11-20	21-30
Karyotip1	İyi	Orta	Kötü		
Sitopeniler2	0/1	2/3			

Klinikte iyi risk temelinde seçilecek tedavide IPSS sisteminin yararlı bulunduğu, ancak ileri yaş, kötü performans ya da bağımsız başka hastalık varlığı gibi özelliklerin risk temelindeki tedavi uygulamalarını sınırlandırdığı da belirtilmektedir (37). Ayrıca sitogenetik çalışmaların yapılamadığı durumlarda da IPSS'den yararlanılamayacaktır. Yıllar önce sitopenilerin derecesi ve ilik blast yüzdesinin birleştirilerek yapıldığı Bournemouth, Sanz puanlama sistemi, Düsseldorf sistemi ile diğer çeşitli benzerlerinden bu durumlarda yararlanılabilmektedir. Ayrıca kök hücre ve blastların immüfenotiplerinin, kromozom değişimlerinin, primer ya da sekonder gelişimin ve bazı laboratuvar bulgularının prognostik etkilerini belirleyen ve farklı sistemleri birbirine göre değerlendiren yeni çalışma sonuçları bildirilmekte (48,55,57) ve artmış lenfosit sayısı gibi yeni parametreler ifade edilmektedir.

Çizelge 2.4. IPSS'e göre genel sağkalım ve lösemiye dönüşüm olasılığı (37).

Risk grubu	Puan	Ortanca yaşam (yıl)	% 25 AML ye dönüşüme kadar geçen süre (yıl)
Düşük risk	0	5,7	9,4
Orta-1	0,5-1,0	3,5	3,3
Orta-2	1,5-2,0	1,2	1,1
Yüksek Risk	≥2,5	0,4	0,2

Hernekadar IPSS sağ kalım ve AML gelişimini belirlemede mevcutların en iyisi olarak tanımlansa da henüz hiçbir sınıflama tek başına her konuda tatminkar değildir.

2.2.5. ETİYOLOJİ

MDS'de hastaların %80'inde etiyolojik bir neden ortaya konulamamış olsa da bazı genetik bozukluklar, edinsel faktörler, çevresel/mesleki olarak bazı kimyasallara maruziyet ve kemoterapi tedavisi MDS riskini artırmaktadır (1). Fankoni anemi gibi doğuştan gelen hastalıklar ve down sendromu gibi yapısal genetik bozuklukların MDS riskini artırdığı bilinmektedir (1,58). Ek olarak iyonize radyasyon ve benzen mesleki maruziyet de risk faktörleri arasındadır (59). Genel popülasyonda benzen maruziyetinin en önemli kaynağı sigaradır. Şu anda MDS ile bağlantılı çevresel risk faktörleri sigara (60,61,62), çözücülere maruziyet ve pestisitlerdir (62,63). Düşük yoğunluktaki manyetik alan ile MDS gelişimi

arasında ilişki mevcuttur (64). Tedavi ile ilişkili MDS özellikle hodgkin hastalığı, non-hodgkin lenfoma, meme kanseri ve çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi (ALL) gibi tedavi edilebilir hastalıkların kemoterapisi sonrası gözlenen ciddi bir komplikasyondur (65). Bu hastalıkların tedavisinde radyasyon, alkilleyici ajanlar ve topoizomeraz II inhibitörleri kullanıldı ise MDS gelişme olasılığı artmaktadır. Kanser tedavisi geçmişi olan MDS'li hastaların sekonder veya tedavi ile ilişkili MDS olduğu öngörülmektedir ve bu hastalar çok daha kötü prognoza eğilimlidir. WHO bu vakaların diğer MDS'lerden ziyade AML ile gruplandırılmasını tavsiye etmektedir (66). Miyeloproliferatif hastalıklarda hidroksiüre kullanımı sonrası AML ve MDS gelişme olasılığı %14'dür. Otoimmün hastalıklar (alerjik değil) MDS gelişim riskini artırabilir. Kök hücre transplantasyonu sonrası MDS gelişme olasılığı %20 düzeyindedir (67). Çocuklarda hodgkin ve ewing sarkomu tedavi sonrası tedavi ile ilişkili MDS gelişebilir. Çocuklarda gözlenen tedavi ile ilişkili MDS'nin bir başka nedeni, aplastik anemi nedeni ile immünbaskılayıcı tedavi ve G-CSF kullanılmasıdır. Bu hastalarda G-CSF kullanılması MDS klonunun gelişimine yol açabilir (68).

2.2.6. MDS PATOLOJİSİ

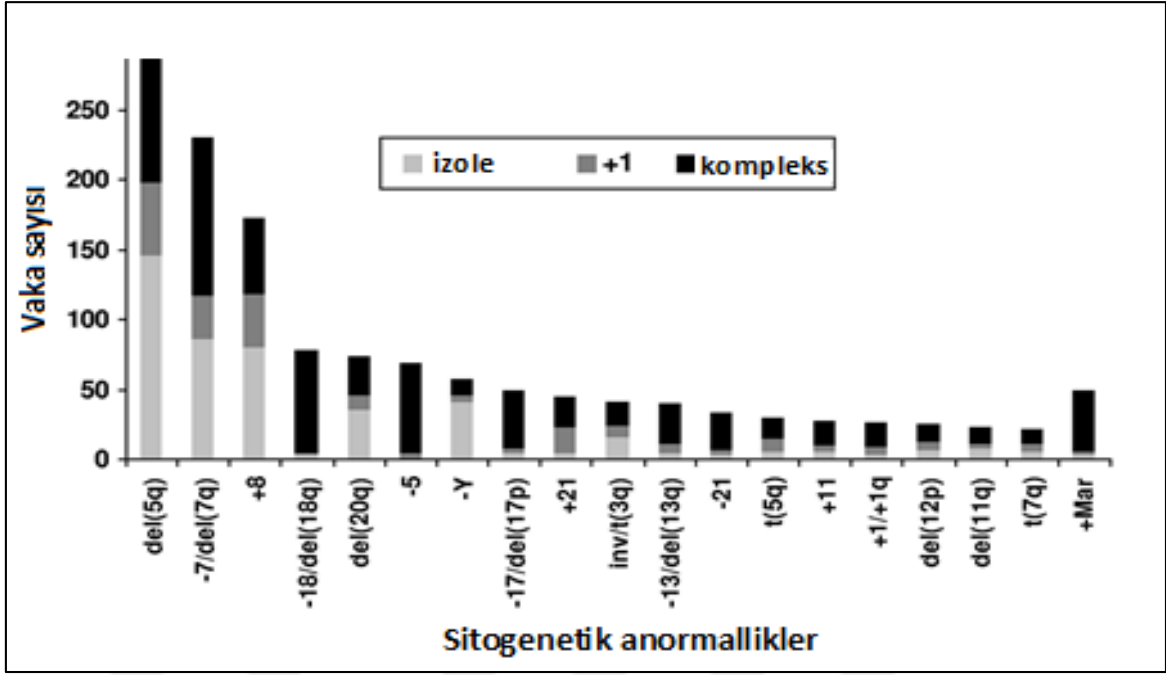
2.2.6.1. Sitogenetik Değişimler

MDS'li hastaların yaklaşık yarısında tanı anında kromozomal anormallikler bulunur. Bu durum hastalığın klonal olduğunu göstermesinden başka prognostik skorlama için önemlidir (69).

Daha önceleri primer olarak değerlendirilen sitogenetik bulguların son yıllarda sekonder olduğu yönünde görüşler ağır basmaktadır. Sekonder bozukluğun ortaya çıkması ise genetik kökenli faktörlerle olabileceği gibi çeşitli çevresel etkenlerle de olabilir. Çevresel etkenler DNA hasarı, genomik kararsızlık, DNA tamir hasarı veya sinyal iletim yollarında bozukluklara neden olarak sekonder bozukluğun ortaya çıkışına sebep olur. Bu durum kromozomların bazı bölgelerinde sıklıkla kaybolmalar veya daha nadiren kazanımlar şeklinde kendini göstermektedir. Çevresel nedenlerin her bireyde hastalık ortaya çıkarmaması ise genetik polimorfizmlerle açıklanmaktadır. Sekonder bozukluk en az başlatan olay kadar önemli olup genellikle üç veya daha fazla anormalliklerin olduğu

sitogenetik bozukluk (kompleks karyotip) veya bir kromozomda birden fazla bölgede delesyonlar şeklinde karşımıza çıkmaktadır (55).

Kromozomal anormallikler MDS için patojenite göstergesi olmamasına rağmen bazı sitogenetik değişiklikler sürekli belirtilmektedir. MDS'de translokasyonlar ve tüm kromozomun kaybı veya kazancı da meydana gelmesine rağmen kromozomal delesyonlar en yaygındır (70). Primer MDS'li hastalarda en yaygın sitogenetik değişiklik tüm vakaların %30'u kadarında görülen kromozom 5 (5q-) delesyonudur (Şekil 2.2) (71). Diğer yaygın değişiklikler trizomi 8 (%19) ve 7q- veya monozomi 7'dir (%15). Kromozom Y kaybı, 17p-, izokromozom 17q ve 3, 11, 12, 13 ve 20 delesyonları gibi ek olarak belirtilen karyotipik değişiklikler hastalığın daha ileriki aşamalarında sık sık gözlenmektedir (71). Primer MDS'li hastaların %10-20'si arasında üç veya daha fazla anormalliklerin olduğu karyotip bulunmaktadır. Tedavi ile ilişkili MDS, monozomi 7, 7q-, monozomi 5 ve 5q- önceki alkile edici ajanlara maruziyete ilişkin en yaygın değişikliklerdir. 11q23'deki değişiklikler genellikle topoizomera II inhibitörleriyle tedaviyi takiben görülmektedir (72). Bu kromozomal değişiklikler hastaların bu grubunda kötü prognozla ilişkilidir. MDS'deki prognostik skorlama sistemi hem kromozomal değişikliklerin varlığı ve hem de tipi ile ilgili ana değişken olarak sitogenetiği içermektedir. IPSS'de normal bir karyotip veya Y varlığı, del(5q) veya del(20q) düşük risk olarak sınıflandırılmaktadır. Üç veya daha fazla anormalliklerin olduğu sitogenetik bozukluk veya kromozom 7 anormalliklerinin varlığı yüksek risk MDS sınıfına girmektedir (37). Diğer tüm değişiklikler orta risk olarak değerlendirilmektedir. Bu kriter aynı zamanda WHO sınıflandırma temelli prognostik skorlama sisteminde de (WPSS) kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. MDS'deki en yaygın sitogenetik anomalilerin frekansı. İzole, +1 ek anomali ve kompleks anomalilere ayrılan MDS'deki en yaygın sitogenetik anomalilerin frekansı görülmektedir (52).

2.2.6.2. Moleküler Değişimler

MDS'de moleküler düzeydeki değişiklikler hala yetersiz bir şekilde tanımlanmıştır. Sıklığı genellikle yüksek olmamasına rağmen çeşitli yeni mutasyonlar MDS'li hastalarda tanımlanmıştır. RUNX1, TP53 ve NRAS gibi en yaygın nokta mutasyonları sadece hastaların azınlığında görülmektedir ve başlıca prognozun kötü olduğu tedavi ile ilişkili MDS'li hastalarda bulunmaktadır (73). CBL, IER3, TET2, ASXL ve miyeloid tümörlerle ilgili diğer genlerdeki yeniden düzenlenmeler ve mutasyonlar tanımlanmasına rağmen MDS'deki rolleri henüz iyi bilinmemektedir.

2.2.6.2.1. Sinyal İletim Değişikliği

RAS alt ailesi H-, N- ve K-RAS genlerinden oluşmaktadır. Bu genler hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynarlar ve hücrel transformasyonla ilişkilidirler (74). RAS proteinleri (p21RAS) plazma membranının iç kısmında yer alır, GDP ve GTP'ye bağlanır ve GTPaz aktivitesi gösterirler. Hücre içi sinyal iletiminde yer alarak çoğalma, farklılaşma, transformasyon ve apoptoza etki ederler (75).

RAS gen mutasyonları nokta mutasyonu şeklinde olup MDS de %10-15, AML' de %20-30 (N-RAS'ın sıklıkla mutasyona uğradığı) oranında görülür. Nokta mutasyonlarının sıklıkla meydana geldiği bölgeler (hot spot) kodon 12, 13 veya 61'de bulunurlar (76). RAS mutasyonları dışındaki diğer değişiklikler RAS yolağının kontrolsüz aktivasyonuna yol açar. GAPs fonksiyon kaybı RAS-GTP düzeylerinde artışa neden olur. RAS gen mutasyonundan başka RAS geninin normalden fazla ifade edilmesi de RAS genini onkogenlere çevirebilmektedir (75). N-RAS mutasyonu içeren MDS kötü prognozla ilişkili olabilir (76). MDS'de N-RAS mutasyonu kısa yaşam süresi ve AML'ye transformasyon riskinde artış ile tanımlanır (77).

Jak kinaz ailesi arasında yer alan JAK2 son zamanlarda miyeloproliferatif sendromların (MPS) patogenezinde önemli rol oynadığı için çok ilgi çekmiştir. Birkaç grup (78,79) JAK2'nin (JAK2V617F) 617. aminoasit pozisyonunda valin-fenilalanin değişikliğini tanımlamışlardır. Bu aminoasit değişikliği kromozom 9'un kısa kolunda bulunan JAK2'nin 12. ekzonunda G-T değişikliği nedeniyle olmuştur (78). Bu mutasyonun sonucu olarak hücreler sitokinlere aşırı duyarlılık göstermiştir (79). Polisitemia vera hastalarının %97'sinde, trombositemili hastaların %57'si ve idiopatik miyelofibrozu hastaların %50'sinde JAK2V617F mutasyonu birkaç çalışmada tespit edilmiştir (78,79). Bu da bu mutasyonun MPS patogenezinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Fakat JAK2V617F mutasyonu MDS'de nadir bulunur ve vakaların %5'inde bulunmuştur (80,81). Son bulgular ring sideroblastlı ve trombositozlu refraktör anemi (RARS-T) olarak adlandırılan MDS'nin belirli bir alt grubunda JAK2V617F mutasyonunu açığa çıkarmıştır. JAK2 mutasyonları normal platelet sayılı RARS hastalarında oldukça nadir olmasına rağmen belirgin trombositozlu RARS-T hastalarının yaklaşık %50'sinde meydana gelmektedir (81,82).

FLT3 geni tirozin kinaz reseptörünü kodlamaktadır ve hematopoetik hücrelerde çoğalma, farklılaşma ve apoptozun düzenlenmesinde ilişkilidir. FLT3 genindeki mutasyonlar MDS'de daha azdır, fakat AML'de çok sıktır (MDS'de %5, AML'de %25-30) ve AML'de kötü prognozu göstermektedir (83,84). FLT3'ün en sık görülen mutasyonları juxtamembran domain içindeki internal tandem duplikasyonları (ITD) ve FLT3 yolağının

ligand-bağımsız aktivasyonuna yol açan tirozin kinaz domainindeki (TKD) nokta mutasyonlarıdır.

Nükleofozmin (NPM1) geni kromozom 5'de q35 bandında bulunmaktadır ve solid tümörlerin ve hematolojik malignitelerin çeşitli tiplerinin tümörigenezinde ilişkili olan çok fonksiyonlu bir proteini kodlamaktadır. NPM1 farklı biyolojik fonksiyonlardan sorumlu olan fonksiyonel domainleri içermektedir. NPM1 nükleus ve sitoplazma arasında gelip giderek ribozomal biyogenez, stres uyarısına yanıt, hücresel ploidi kontrolü ve genomik kararlılığın devamlılığı, DNA tamir süreçleri ve kromatin yoğunlaşmasının ayarlanmasıyla DNA transkripsiyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli hücresel süreçlerde yer alır (85). Farklı hücresel süreçlerdeki rolü nedeniyle NPM1 protoonkogen ve tümör süpresör geni olarak atfedilmiştir.

AML'de NPM1 mutasyonlarının yüksek sıklığının aksine bu mutasyonlar MDS'de nadirdir. Zhang ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada (86) 38 MDS hastasından sadece ikisinde (%5.2) NPM1 mutasyonları bulmuştur; biri RA ve diğeri RAEB1. Bu bulgular diğ er grupların sonuçlarıyla uyumludur (87,88). Önceden belirtilen veriler NPM1 mutasyonlarının MDS hastalarının bir alt grubunda rol oynayabileceğini göstermektedir, fakat MDS'nin başlangıcı ve ilerlemesine tam katkısının anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gereklidir.

2.2.6.2.2. Transkripsiyon Faktörleri ve Hücre-Döngüsü Kontrol Değişiklikleri

İnsan AML1 geni (CBFA2, PEBP2 α B, veya RUNX1 olarak da bilinir) 21q22 kromozomal bandında bulunur ve bir heterodimerik transkripsiyon faktörü olan insan kor-bağlayıcı faktörü (CBF) oluşturan iki altbirimden birini kodlar. AML1 proteini CBF'nin beta alt birimiyle heterodimerizasyon ve DNA bağlayıcılığında sorumlu olan küçük domain olarak adlandırılan 128 aminoasitlik ve evrimsel olarak oldukça korunmuş domain içerir. AML1 normal olarak tüm hematopoetik serilerde ifade edilir ve miyeloid farklılaşmada önemli rol oynayan hematopoeze özel çeşitli genlerin ifadesini düzenler (89). AML1 mutasyonları AML vakalarının yaklaşık olarak %25'inde meydana gelir (çoğunlukla AML M0) ve aşırı blastlı MDS'de sıklıkla gözlenir (90). AML1 mutasyonlarıyla AML1 fonksiyon kaybının MDS/AML başlangıcı için tek başına yeterli olmadığı gösterildiği için

epigenetik değişiklikler (metilasyon ve deasetilasyon) AML1 mutasyonunu taşıyan MDS/AML'nin gelişimini teşvik edebilir.

Ekotropik viral integrasyon site 1 (EVI1) geni kromozom 3q26.2 bandında bulunmaktadır ve bir onkoprotein olarak görev yaptığı gösterilen, 10 çinko parmak motifi içeren geniş nükleer proteini kodlar. EVI1'in iki formu bulunmaktadır: 145 kDa EVI1 geni ve MDS1/EVI1 genidir (91). EVI1 ve MDS1/EVI1'in hematopoetik hücrelerdeki yetersiz ifadesi miyeloid bozuklukların (AML veya MDS) gelişimi veya ilerlemesiyle ilişkilidir (92).

Yetersiz aktivite translokasyonlar veya inversiyonlar gibi 3q26 yeniden düzenlenmelerinden kaynaklanmaktadır. Fakat birkaç grup 3q26'nın yapısal değişikliği olmaksızın kısmen MDS'deki EVI1'in sık ifadesini rapor etmiştir. Bu da muhtemelen EVI1 ifadesiyle ilişkili promotor düzenlenmesinin bozulmasını göstermektedir (93). MDS hastalarında EVI1 ifadesi çok kötü prognostik göstergedir ve şiddetli eritropoetin (EPO)-tepkisiz anemiyle ilişkilidir (94). Ek olarak aynı zamanda MDS'de kötü bir prognozu gösteren bir özellik olan EVI1 ifade ve kromozom 7'deki delesyonlar arasında bir ilişki olduğu görülmektedir (95). EVI1'in gen ifadesini değiştirme mekanizması henüz tam olarak anlaşılammaktadır. EVI1 bir taraftan hedef genlerde bir baskılayıcı olarak ve diğer taraftan bir aktiveleştirici olarak rol oynamaktadır. EVI1 hematopoetik hücrelerde büyük ölçüde ifade edilen eritroid ve megakaryositik farklılaşmayla ilişkili bir gen olan GATA2'ye bağlıdır (96). Üstelik Laricchia-Robbio tarafından yapılan araştırmadaki son bulgular EVI1'in DNA bağlayıcı protein olan GATA1 ile etkileşimiyle eritroid farklılaşmasını baskıladığını göstermiştir (97).

p53 gen değişiklikleri MDS'nin %10'unda meydana gelmektedir (98). Anormal klonlu hastaların hücrelerindeki p53 mutasyonu sıklıkla izokromozom 17q'da bulunmaktadır. Bu mutasyonlar genellikle proteinin DNA'ya bağlanabilme yeteneğini engeller. P53 mutasyonları MDS'de hastalık progresyonuyla ve kötü prognozla ilişkilidir.

2.2.6.3. Epigenetik Değişiklikler

MDS'de bazı gen promotorlarının metilasyonu kanıtlanmıştır ve MDS patogenezi katkıda bulunduğu düşünölmektedir. Özellikle sitogenetik değişiklikleri olan MDS'li

hastalardaki delesyona uğrayan 5q bölgesindeki potansiyel tümör baskılayıcı genin varlığının araştırılması aday gen olarak RIL (*reversion induced LIM*) geninin tanımlanmasını sağlamıştır (99). RIL geninin anormal metilasyonu orta-yüksek risk MDS'li hastaların %50'sinde ve düşük risk MDS olarak sınıflandırılan hastaların %6'sında tanımlanmıştır. Yüksek-risk hastalar arasında RIL metilasyonlu olanları, metilasyonsuz hastalar ile 119 hafta sağkalım açısından karşılaştırıldığında 55 hafta ortalama sağkalım gösterirler. Bu da bu genin MDS patogenezindeki rolünü göstermektedir.

Hücre-döngüsünün düzenlenmesinde önemli rolü olan genler siklin bağımlı kinaz inhibitörleri p15INK4b ve p16INK4a'dır (100). Siklin-bağımlı kinaz inhibitör genleri olan p15INK4B ve p16INK4A tümör baskılayıcı genler içinde yer almaktadır ve pek çok tümörde genetik değişiklikler sonucu aktivasyonları kaybolmaktadır. Özellikle anormal metilasyon ile bu genlerin aktivasyonunun bozulması hematolojik malignitelerde sıktır. P15INK4B metilasyonu MDS de %30-50 oranında görülmektedir. Bu genin metilasyonu ile lösemik hücreler TGFβ'nın etkisinden kurtulmaktadırlar. Bu iki gen nadiren mutasyona uğramaktadır, fakat p15INK4b geninin transkripsiyonu bu genin promotor bölgesinin anormal metilasyonu nedeniyle sık sık susturulur. Böylece siklin-bağımlı kinaz 4 ve 6'yı baskılayarak hücre döngüsünü negatif olarak düzenleyen proteinleri kodlayan p15ink4b geninin promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonu yaygın bir şekilde orta-yüksek risk MDS'de meydana gelir ve P15 gen ifadesinin kaybıyla ilişkilidir (100). Birkaç çalışmada MDS hastalarının yaklaşık %50'sinin bu değişikliği gösterdiği belirtilmiştir (100,101). Tanıda p15ink4b hipermetilasyonlu hastalar normal metilasyonlu örneklerine göre önemli derecede daha kısa sağkalım gösterirler. Genin metilasyonu blastların yüzdesiyle ilişkilidir ve metilasyon varlığı hastalık ilerlemesine işaret edebilir, çünkü AML'ye dönüşen hastalarda p15ink4b metilli hücrelerde artış tespit edilmiştir (102). MDS'de aynı zamanda E-kaderin (CDH1), estrogen reseptör (ER), MYOD1, HCI ve kanser 1 (HIC1) gibi diğer genlerin anormal metilasyonu (hipermetilasyon) sessizleşen tümör baskılayıcı genlerin örnekleri olarak belirtilmiştir. Ek olarak bu genlerin hipermetilasyonu erken aşama MDS'de kötü prognozla ilişkilidir (103).

Genetik değişikliklerin aksine DNA metilasyonu ile genlerin susturulması geri dönüşümlü bir süreçtir ve demetile edici ajanlar (5-azasitidin, desitabin ve 5-aza- 2'-deoksisitidin) ile tedavi, özellikle yüksek-risk MDS'de umut verici sonuçlar vermiştir (104).

Nükleozomal histonların asetilasyonu ve deasetilasyonu transkripsiyonal süreçte kritik rol oynamaktadır. Histon asetilazlar (HAT) tarafından katalizlenen histonların aminoasitlerinin asetilasyonu nükleozom yapısının açılmasına ve sonra transkripsiyon ile sonuçlanan histon-DNA etkileşiminin bozulmasına yol açmaktadır. HAT'ların karşıtı kromatin yapısını kararlılaştıran ve promotör sekanslarını ulaşılamaz kılarak bu bölgedeki genlerin sessizleşmesine yolaçan, histonlardan asetil gruplarını çıkaran histon deasetilazlar (HDAC)'dır (105). Fakat HDAC inhibitörü olarak bilinen valproik asitin (VPA) *in vitro* ortamda lösemik hücre hatlarının farklılaşması ve apoptozunu tetiklediği gösterilmiştir. Kuendgen ve arkadaşları (106) VPA'nın IPSS kriterlerine göre MDS hastalarının %30'una kadar yanıt oranı olan MDS'de bazı etkileri olduğunu göstermiştir (107). Yanıt oranları kemik iliğinde normal blast sayılı hastalarda yüksektir (%50). Yanıt oranı ve IPSS arasındaki ilişki düşük riskli MDS hastalarında vakaların %70'e kadarının tepki verdiğini göstermiştir. Üstelik DNA metilasyonu ve histon asetilasyonunun birbiriyle yakından bağlantılı olduğu gösterildiği için demetile ajanlar ile VPA'nın birleşiminin MDS ve AML'nin ileri aşamalarında ek etkileri olduğuna dair kanıtlar vardır (108,109).

2.3. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML)

2.3.1. TANIM VE TARİHÇE

Akut lösemiler, hematopoetik progenitör hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu gelişen ve lösemik hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma kusuru göstermeleri ile, normal kan hücrelerinin yapılamaması, aşırı çoğalma kabiliyeti gösteren lösemik hücrelerin kemik iliğini, periferik kanı ve takiben diğer dokuları istila etmesi ile tanımlanan kemik iliğinin malin bir grup hastalığıdır (110). Akut miyeloblastik lösemi (AML), miyeloid, monosit, eritroid ve megakaryositik hematopoetik öncüllerde olgunlaşmanın erken dönemde durakladığı malin bir hastalıktır. Hematopoetik öncüllerde olgunlaşmanın duraklaması ve blastların hızlı çoğalması, programlı hücre ölümü olan apoptoz yapabilme özelliğinin azalması sonucunda kemik iliği, dalak, karaciğere sızma ve normal kan hücrelerinin hızla

azalmasıyla çeşitli derecelerde anemi, trombositopeni ve lökosit sayısında değişiklikler meydana gelmektedir (111).

Hipokrat'ın lösemi belirti ve bulgularından bahsettiği bildirilmekle birlikte, lösemnin klinik bulgularının yeterince tanımı ilk kez 1827 yılında Velpau tarafından yapılmıştır. Ancak tanısal gelişmeler 1839–1845 yılları arasında olmaya başlamıştır. 17. yüzyılda Malpighi'nin mikroskobun önemini fark etmesi, hematoloji tarihinde önemli bir dönüm noktasını oluşturmuştur. Hastada lösemnin ilk fark edilmesi 1845'de Carigie ve Bennett, ardından 1846'da Virchow tarafından olmuştur. 1847'de Virchow "lösemi" kelimesi ile hastalığın adını koymuştur (112). İyi tariflenmiş ilk akut lösemi olgusu Friedreich'e (1857) atfedilmekle birlikte, 1889'da "akut lösemi" tanımını ilk kullanan Ebstein olmuştur (110). 1879'da Ehrlich tarafından boya tekniklerini tanımlaması ve lökositleri granüllerine göre ayırımının yapılmasını takiben Naegli tarafından ilk miyeloblast ve miyelosit tanımı yapılmıştır (1900) (110,112). 1913 yılında bir Türk hematoloğu olan Hasan Reşad Sığındı ile birlikte Schilling-Torgau ilk monositer lösemiye tanımlamışlardır (110). 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orijinal akut lösemi FAB sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemiler morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır. Ancak FAB sınıflaması immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır (113).

2.3.2. EPİDEMİYOLOJİ

AML çocukluk çağı lösemilerinin %15-20'sini oluşturmaktadır (111). AML'nin görülme insidansı 2.7/100 000'dir. Ortalama görülme yaşı 65'tir (114). Yeni doğan döneminde lösemilerin en fazla görülen tipidir, ancak çocukluk ve adolesan döneminde görülme oranı düşer. Erişkin yaşta görülen akut lösemilerin ise %80'ini AML oluşturur (115). AML 40 yaşın altındaki kişilerde nadiren görülür, bununla birlikte insidansı yaşla birlikte artış gösterir. ABD'de yılda yaklaşık 13000 kişi AML tanısı almaktadır. 2000-2003 yılları arasında ABD'de 65 yaşın altında AML insidans oranı 1.8/100 000 iken, 65 ve üzerindeki yaşlarda insidansı 17/100.000'ye kadar çıkmaktadır. AML erkeklerde ve beyazlarda biraz daha sık görülmektedir (114). Tüm AML vakalarının %10-20'sinden sorumlu olan

sekonder AML insidansı kanser terapisinde DNA'ya hasar veren ajanların yüksek doz yoğunluğunda kullanımı nedeniyle artmaktadır (116).

2.3.3. SINIFLANDIRMA

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından akut lösemi FAB sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemiler morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır (Çizelge 2.5) (113).

Çizelge 2.5. AML'de FAB sınıflaması (111,117).

Akut Miyeloid Lösemi	
Alt Tip	Tanımlama
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositik lösemi (APL)-hipergranüler tip
M3v	APL'nin mikrogranüler varyantı, hiperlökositoz ve ciddi koagülopati ile birlikte, prognoz kötüdür
M4	Akut miyelomonositik lösemi
M4eo	Eozinofili ile birlikte akut miyelomonositik lösemi
M5	Akut monositik lösemi (M4 ve M5 özellikle <2 yaşta sıktır)
M5a	Farklılaşma olmaksızın akut monositik lösemi (monoblastik)
M5b	Farklılaşma ile birlikte akut monositik lösemi
M6	Akut eritroid lösemi-Eritrolösemi (Diguglielmo hastalığı)
M7	Akut megakaryositik lösemi (Miyelofibroza birlikte, blastlardaki sitoplazmik çıkıntılar belirgindir, sıklıkla trizomi 21'li çocuklarda görülür)

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem arz etmesi nedeniyle yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiştir. 2001 yılında WHO tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hematopoetik ve lenfoid neoplazmları içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. WHO sınıflamasında morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmış, akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (113,118). WHO sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Akut miyeloid lösemiler: a. tekrarlayan sitogenetik anomalilerle seyreden AML, b. çoğul seri displazisi ile

seyreden AML, c. tedaviye ikincil AML ve MDS, d. tanımlanan gruplara girmeyen AML olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2.6) (112,113,118).

Çizelge 2.6. AML’de WHO sınıflaması (113,118).

1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML

- t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile AML
- inv(16)(p13q229 veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH11) ile AML
- Akut promiyelositer lösemi t(15;17)(q22;q22), (PML/RARα) ile AML)
- 11q23 (MLL) anomalisi ile AML

2. Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML

- Önceden miyelodisplastik sendromlu
- Önceden miyelodisplastik sendrom olmadan

3. Tedaviye İkincil AML ve MDS

- Alkilleyici ajanlarla ilişkili
- Topoisomerez II inhibitör ile ilişkili

4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML

- Minimal farklılaşma gösteren AML
- Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik
- Akut miyelofibrozis ile panmiyelozlösemi
- Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
- RARα rearrajmanı göstermeyen akut promiyelositer lösemi
- Akut miyelomonositik lösemi
- Akut monoblastik ve monositer lösemi
- Akut eritrolösemi
- Akut megakaryoblastik lösemi
- Akut bazofilik lösemi
- Miyeloid sarkom

2.3.4. PROGNOZ

Tedaviye yanıt gösterecek hasta olasılığını öngörmeye AML heterojenitesini yansıtan çok sayıda klinik ve biyolojik özellik kullanılmaktadır. Kötü prognostik faktörler; 60 yaş üstünü, tedavi öncesi kötü performans skoru, önceki kemoterapiden veya MDS gibi

hematolojik bir bozukluktan kaynaklanan AML ve her milimetreküpte 20.000'den fazla beyaz-hücre sayısı veya artan serum laktat dehidrogenaz seviyesini içermektedir. Üstelik çoklu ilaç direnci ve immünfenotiplendirme değerlendirmesi prognostik bilgi sağlayabilir. Lösemik blastların detaylı sitogenetik analizinin aynı zamanda kritik prognostik bilgi sağladığı gösterilmiştir. FAB alttipi M3 AML ve t(15;17) translokasyonu arasındaki gibi belirli FAB alttipi ve sitogenetik anormallikler arasındaki bağlantılara rağmen anormalliklerin kendilerinin daha önemli prognostik faktör olduğu görülmektedir. Bu klinik ve laboratuvar verisi AML'nin üç geniş prognostik gruba ayrılmasını sağlamıştır: iyi, orta ve kötü. Bu grupları tanımlamada kullanılan kriterde ince farklılıklar olmasına rağmen prognostik ayırım, daha önemli olan çeşitli sitogenetik anormalliklerin varlığıyla mümkündür (119-121).

60 yaşında veya daha genç olan hastalar arasındaki vakaların yaklaşık olarak %20'sini içeren iyi prognostik altgrup t(15;17), t(8;21) veya inv(16) mutasyonlu lösemik blastların varlığıyla veya bu anormalliklerin moleküler kanıtıyla tanımlanmaktadır. Bu mutasyonlar tam remisyonun yüksek oranına (%85'den daha fazla) ve nispeten düşük risk relapsa (%30-40) sahip daha genç hastalarda daha sıktır. Ayrıca yaşları 15-60 arasındaki hastaların yaklaşık olarak %15'ini içeren kötü prognostik altgrup vardır. Bu istenmeyen vakalar 2 kromozomdan fazla, kromozom 5 veya 7 delesyonu olan monozomi, kromozom 5'in uzun kolunun delesyonu (del5q) veya kromozom 3'ün uzun kolunun anormallikleriyle ilgili sitogenetik anormallikleri olan lösemik blastların varlığıyla tanımlanmaktadır. Bu anormallikler daha yaşlı hastalarda ve sekonder AML'li hastalarda daha sıktır, fakat genç hastalar arasında bile hayatta kalma oranı 5 yılda %20'den daha azdır. Bu hastalar transplantasyon gibi tedavi yaklaşımı olmayan oldukça terapötik direnç gösterirler. Orta risk relaps ile tanımlanan hastalar bu iki grup arasındadır. Bu hastaların lösemik blastları normal karyotiptir veya diğer alt grupların tanımında bulunmayan sitogenetik anormallikleri vardır. 60 yaşından daha yaşlı olan hastaların 5 yıl %10'dan daha az yaşama olasılığı (kötü prognozu işaret etmektedir) vardır (122). Genç AML hastalarının aksine daha yaşlı AML hastaları daha kötü sitogenetik anormallikler (-7, 7q-, -5, 5q-, veya kompleks karyotipler) ve diğer kötü prognozu gösteren biyolojik özellikler (kemik iliği hasarı ve ilaç direncinde artış) ile ilişkilidir. Yaşlı AML hastalarında görülen önemli

derecedeki daha kötü prognoz kısmen bu kötü sitogenetik anormallikler ve biyolojik özelliklerin daha yüksek sıklığıyla açıklanabilir (123, 124).

2.3.5. ETİYOLOJİ

AML etiolojisinde birçok faktör yer almasına rağmen çoğu hastada tanımlanabilen bir risk faktörü yoktur (*de novo* AML) (111). Olguların çoğunda etiyolojik bir faktör saptanamamakla birlikte AML gelişiminde çeşitli risk faktörleri bildirilmiştir. Çevresel faktörler, genetik bozukluklar, önceden uygulanan kemoterapi, radyoterapi ve daha önceden mevcut olan hematolojik hastalıklar AML için birer risk faktörüdür (58).

AML gelişiminde çeşitli çevresel etkenler sorumlu tutulmaktadır. Bu etkenler arasında iyonize radyasyonun AML için risk faktörü olduğu bilinmektedir. Japonya'ya atılan atom bombasına maruz kalan Japonlarda AML insidansında bir artış görülmüştür. Atom bombasına maruziyetten 5-7 yıl sonra AML görülme insidansı pik yapmıştır (125). Tedavi amacıyla uygulanan radyasyonun da AML gelişiminde bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (126). Alkilleyici ajanlar (siklofosamid, melfalan, nitrojen mustard vb.) ve topoizomeraz II inhibitörleri (etoposid, teniposid vb.) gibi kemoteropatik ajanların kullanımı sekonder AML etiolojisinde yer alan kemoterapötiklerdir (127).

Kloramfenikol, fenil butazon, klorokin ve metoksip soralen gibi ilaçlar da ilik hasarına ve daha sonra da AML'ye neden olabilir. Benzen, üzerinde en fazla çalışılan potansiyel lökomojenik ajandır. Bunun yanı sıra boyalar, pestisidler, herbisidler ve etilen oksit de AML risk artışına neden olan ajanlardır. Sigara içiciliği de özellikle 60-75 yaş arasındaki kişilerde AML gelişiminde bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (58,114).

AML gelişen hastaların bir kısmında önceden miyeloid olmayan hastalıklar bulunabilmektedir. Aplastik anemi, multiple miyeloma veya AIDS gibi miyeloid olmayan hastalıklarda AML gelişebilmektedir. İmmüntiroid hastalıklar ve ailesel poliendokrin hastalıklar ile AML arasında bir ilişkinin olabileceği öne sürülmektedir (128,129). Bunun dışında doğuştan kazanılmış genetik bozukluklardan bloom sendromu, fankoni anemisi, kostmann sendromu, wiskott-aldrich sendromu, ataxia telanjiektazi sendromu, down sendromu (trizomi 21), klinefelter sendromu, patau sendromu (trizomi 13), shwachman sendromu, neurofibromatozis ve li-fraumeni sendromu AML gelişimindeki risk

faktörleridir. Down sendromlu çocuklarda AML gelişim oranı normal çocuklara göre 10-20 kat daha fazla bulunmuştur (58,114).

AML, MDS, miyeloproliferatif hastalık (polisitemia vera, kronik miyeloid lösemi, primer trombositemi, miyelofibrozis) gibi multipotansiyel hematopoetik hücrenin klonal bozukluğu ile tanımlanan hastalıkların seyri sırasında ortaya çıkabilir. Polisitemia vera veya esansiyel trombositemi gibi hastalıkların seyri sırasında kemoterapi veya radyoterapi uygulamaları AML'ye dönüşüm sıklığını artırabilir (115). En önemli risk faktörlerinden biri etiyolojisi bilinmeyen, haftalar, aylar veya yıllar boyunca ilerleyici sitopenilerle tanımlanan MDS'dir. MDS'nin RAEB-II alt tipinde sıklıkla AML gelişir. Karsinojenleri metabolize eden NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz (NQO1) gibi enzimlerin polimorfizmi artmış AML riski ile birliktedir. Glutasyon S-transferaz enzimi polimorfizmi de sekonder AML gelişimi ile birliktedir. Bir granülositik farklılaşma faktörü ve bZIP ailesi üyesi olan "CCAAT/enhancer binding protein, alpha" genini kodlayan CEBPA mutasyonu bir ailenin 3 üyesinde tanımlanmıştır (111).

2.3.6. AML PATOLOJİSİ

2.3.6.1. Genetik Değişiklikler

2.3.6.1.1. Anormal Çoğalma

Hücre çoğalması normal hücrelerde büyüme faktörlerinin ve adezyon sinyallerinin varlığıyla düzenlenmesine rağmen, lösemi hücreleri bu düzenleyici mekanizmaların bozulması nedeniyle anormal şekilde çoğalma gösterir. Bu anormal çoğalma genellikle çoğalmayı sağlayan sinyal yollarını etkileyen mutasyonların sonucundadır. Kronik miyeloid lösemi (KML)'deki BCR-ABL tirozin kinazın keşfini takiben diğer aktive olmuş kinazlar AML patogeneziyle ilişkilidir. FLT3 tirozin kinaz hemen hemen AML'li hastaların tümünde ifade edilir. FLT3 tirozin kinaz AML'nin yaklaşık olarak %30'unda juxtamembran domain içindeki internal tandem dublikasyonu veya kinazın aktivasyon ilmeği içindeki mutasyonla aktive edilir (130).

C-Kit tirozin kinaz AML hastalarının %60-80'inde ifade edilir. Bu kinaz mast hücre lösemisinde ve bazı AML vakalarında mutasyonla aktive edilir. Jak2 kinaz, AML'ye

dönen polisitemia veralı hastaların çoğunluğunda ve essential trombositemia veya idiopatik miyelofibrozis (131) hastalarının büyük oranında V617F nokta mutasyonu ile aktive edilir. Aktifleşen Jak2 çoğalmayı uyarır. V617F JAK2 mutasyonu MDS'li hastaların %5'inde bulunur. Bu da bu mutasyonun AML'ye dönüşen hastalarda da bulunduğunu gösterir (132).

Aktifleşen tirozin kinazlar küçük G proteinlerinden olan RAS ailesinin katılımıyla ve reseptör tirozin kinaz mutasyonlarının etkilerini taklit eden proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonla çoğalmayı sağlayan sinyalleri iletir. NRAS mutasyona uğrayarak AML hastalarının %10-20'sinde aktive edilir, KRAS AML hastalarının %5-15'inde mutasyona uğrayarak aktive edilir. HRAS ise nadir olarak mutasyona uğrar (133). RAS mutasyonu içeren AML örneklerinde kinaz füzyonlar veya aktive edici mutasyonlar yoktur. AML'de genellikle reseptör tirozin kinaz yolları fonksiyon kazanımı mutasyonlarıyla aktive edilir. GTPaz aktivitesini artırarak RAS'ın aktivitesinin kaybolmasına yol açan tümör baskılayıcı protein olan Nörofibromin (NF1)'in ifade kaybı istisnadır. Nörofibromatozis'li çocuklarda bir NF1 alelinin germ hattı kaybı vardır ve bu çocuklarda juvenil miyelomonositik lösemi (JMML) veya AML gelişebilir. Ancak, NF1 kaybı *de novo* çocuk ve erişkin AML'de nadirdir. Reseptör tirozin kinaz yolağını aktive etmenin bir başka yolu nokta mutasyonu ile SHP-2/PTPN11'in fosfataz aktivitesinin aktivasyonudur. Belirli ana substratlardan fosfat gruplarının ayrılması reseptör tirozin kinaz yollarıyla sinyalizasyonu uyarır. JMML'de *de novo* AML hastalarının küçük oranında SHP-2 aktive edici mutasyonlar bulunur (134). Reseptör tirozin kinaz yolak mutasyonları AML'li hastaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir. Tüm AML vakalarının hücre çoğalmasını sağlayan sinyallerde bozukluğa yol açan genetik anormallikle ilişkili olduğu varsayılabilir.

Sinyal yolak anormalliklerinin tanımlanması AML'de potansiyel terapötik hedef olabilir.

2.3.6.1.2. Farklılaşmanın Durması

AML'de transkripsiyon faktörleri kromozomal translokasyonlar veya nokta mutasyonu sonucu füzyona uğrayarak çoğunlukla bozulmuştur. Kromozomal yeniden düzenlenmelerle etkilenen faktörler: kor bağlayıcı faktör (CBF) kompleksi, retinoik asit reseptör (RAR), MLL protein ve Hox proteinleridir. C/EBP α ve PU.1 gibi miyeloid transkripsiyon

faktörlerindeki nokta mutasyonları aynı zamanda AML’de normal miyeloid farklılaşmanın kaybına yolaçar.

CBF kompleksi RUNX1 (önceki adı AML1) ve CBF β protein kompleksinden oluşur ve normal miyeloid gelişim için kritik olan genleri aktive eder. AML’de bu kompleks faktörü en az üç translokasyonla bozulur: Runx1-MTG8 füzyonunu oluşturan t(8;21), CBF β -MYH11 füzyonunu oluşturan kromozom 16’nın inversiyonu ve MDS ve terapiyle oluşan AML ile ilişkili RUNX1-EVI1 füzyon proteini oluşturan t(3,21) translokasyonu. Bu füzyonların tümü en azından kısmen CBF kompleksinin baskın negatif formları olarak görev yapar. Ek olarak RUNX1’in DNA bağlayıcı domainindeki nokta mutasyonlar AML’nin nadir vakaları yanısıra lösemiye eğilimi olan olan ailesel trombosit bozukluğuyla ilişkilidir. Bu bulgular RUNX1 fonksiyon kaybının farklılaşmada bozulmaya ve lösemiye yol açtığını göstermektedir. RUNX1-MTG8 füzyonu RUNX1 ile aktive edilen genleri baskılar (135,136). MTG8, histon deasetilazlara ve transkripsiyon faktörlerine bağlanan bir transkripsiyonal baskılayıcıdır. DNA metiltransferazlar aynı zamanda potansiyel olarak hedef genlerin daha uzun süren epigenetik sessizleşmesine yolaçan RUNX1 hedef genlerine de bağlanırlar (137). RUNX1 hedef genlerinin baskılanması normal farklılaşma programını engeller.

p14 ARF’nin baskılanması fonksiyonel olarak p53’ü bozar ve lösemik bir hücrede diğer mutasyonların oluşumuna izin verir. Histon deasetilaz inhibitörleriyle tedavi RUNX1/MTG8 barındıran hücre hatlarının farklılaşmasını uyarır. Alternatif olarak Runx1/MTG8 onkoproteiniyle yardımcı baskılayıcıların etkileşimini engelleyen bir peptid ifadesi aynı zamanda transkripsiyonal baskılamayı tersine çevirir ve hücre farklılaşmasının devamını sağlar (138).

RUNX1-MTG8 ve diğer füzyon onkoproteinleri aynı zamanda lösemi patogenezi için önemli olan genleri aktive eder. RUNX1-MTG8, insan CD34⁺ hücrelerinde ifade olduğunda olgunlaşmamış hücrelerin sürekli kendini yenilemesine izin verir (139). Benzer şekilde RUNX1-MTG8 fare kemik iliğinde ifade edildiğinde *ex vivo* kemik iliği progenitör hücrelerinin yenilenmesini sağlar. Bu gözlem PML-RAR α füzyon proteini yanısıra RUNX1-MTG8 füzyonunun Wnt sinyal yolağı bileşenlerinin ifadelerini aktive ederek kök hücre yenilenmesini artırdığını gösteren çalışmalarla uyumludur (140,141).

Runx1-MTG8 kendi başına AML oluşturmak için yetersizdir. Fakat fare kemik iliğinde aktive olan tirozin kinaz ile birlikte Runx1-MTG8'in birlikte ifadesi miyeloid lösemiye başlatabilir (142). Fakat son yayınlanan bir makalede RUNX1-MTG8'i ifade eden faredeki spontan bir mutasyonun lösemiye başlatan füzyon proteininin oluşumuna yol açtığı sürpriz bir sonuç gösterilmiştir (143). Bu sonuç reseptör tirozin kinaz yolağının mutasyonunun AML patogenezi için daima gerekli olmadığını göstermektedir.

AML'de farklılaşmanın durmasının net bir örneği olan akut promiyelosit lösemi (APL) daima retinoik asit reseptör-alfa (RAR α) yeniden düzenlenmesiyle ilişkilidir. RAR α lokusuyla ilgili bilinen 5 translokasyon vardır. En sık görülen ve en çok çalışılan t(15;17) translokasyonu PML-RAR α gen füzyonuna yol açar (144). APL vakalarının %98'inden fazlası PML-RAR α füzyon proteini oluşturan t(15;17) ile ilişkilidir. t(11;17) ile ilişkili olan PLZF-RAR α füzyonu hastalığın retinoik asit direnç formuna yol açar ve vakaların %1'den azını temsil eder.

ATRA ve arsenik, APL tedavisinin dayanak noktasıdır ve RAR hedef genlerinin yeniden aktivasyonu ve PML-RAR füzyonunun yıkımıyla promiyelositlerin farklılaşmasına yol açarak işlev gördüğü düşünülmektedir. AML'nin diğer formundaki farklılaşma terapisi denemelerinde sınırlı başarı sağlanmıştır. Histon deasetilaz inhibitörü VPA yalnız veya ATRA ile birlikte verildiğinde hastalarda farklılaşma ve blast sayılarında azalmayı sağlamıştır (106).

Kromozomal translokasyonlardaki ilişkisine ek olarak AML1 fonksiyonunun aynı zamanda AML'de bozulduğu bulunmuştur. AML1 haploetersizliğiyle bir ailesel trombositopeni bozukluğu sıklıkla AML ile ilişkilidir (145) ve somatik AML1 mutasyonları sıklıkla olgunlaşmamış bir fenotiple karakterize edilen AML vakalarında tanımlanmıştır (146). Bu mutasyonlar çoğunlukla AML1'in RUNT homoloji domaini içinde meydana gelir ve böylelikle AML1'in DNA bağlayıcılığını engelleyerek transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonunu bozmaktadır.

Miyeloid farklılaşmasındaki transkripsiyon faktörleri Pu.1, C/EBP α ve GATA-1'in önemli fonksiyonu ve AML ilişkili füzyon proteinleri ile gözlemlenen fonksiyonel inaktivasyon dikkate alındığında bazı gruplar AML'deki bu transkripsiyon faktörlerinin

inaktivasyonunun anlamını araştırmışlardır. Buna rağmen kromozomal translokasyonlarda ilişki tespit edilememiştir. Ancak bu üç transkripsiyon faktörünün AML hastalarının alt gruplarındaki somatik mutasyonlarla etkilendiği bulunmuştur.

Pu.1 mutasyonları son zamanlarda AML hastalarının %7'sinde tanımlanmıştır (147). şimdiye kadar bu mutasyonların AML patogenezinine nasıl katkıda bulunduğu bilinmemekteydi. Bu mutasyonlar baskın bir negatif protein oluşturmaksızın genin bir alelinin fonksiyonunu bozar. Transkripsiyon faktörlerinin mutasyonları ya olgunlaşmamış fenotipli (FAB M0), miyelomonositik veya monositik alttiplerde (FAB M4 veya M5) veya eritrolösemili (FAB M6) AML hastalarının grubu içinde bulunmuştur.

Son yıllarda bazı gruplar benzer sıklıktaki AML vakalarının %10'u kadarında meydana gelen somatik C/EBP α mutasyonlarının iki tipini rapor etmiştir (148,149). Bu mutasyonlar ağırlıklı olarak AML FAB M1 veya M2 alttiplerinde meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar diğer C/EBP aile üyeleriyle proteinin dimerizasyonu yanısıra DNA-bağlanmasını da bozar (149). Mutasyonların ikinci tipi proteinin N-terminal bölgesini kodlayan bölge içinde çerçeve kaymasına neden olur. Bu mutasyon sadece N terminal kısmını iğer C/EBP α proteinin (30 kDa) daha kısa formunun translasyonuna neden olur (148,149). Bu protein, baskın negatif tarzdaki normal C/EBP α 'yı baskılar (148). C/EBP α mutasyonları varlığının nispeten iyi prognostik işaret olduğu belirtilmektedir (150,151).

Yukarıda bahsedildiği gibi Pu.1 ve C/EBP α fonksiyonunun bozulması AML'de bazı primer genetik anormalliklerde yaygındır. C/EBP α , Flt3-ITD ve AML1-ETO tarafından inaktive edilirken veya transkripsiyonel olarak baskılanırken, fizyolojik Flt3 sinyali Pu.1 fonksiyonunu uyarmasına rağmen Pu.1 Flt3-ITD tarafından transkripsiyonel olarak baskılanabilir (152). Pu.1 fonksiyonunun bozulmasının önemi hala anlaşılamamasına rağmen C/EBP α 'nın farklılaşma uyarıcısı fonksiyonu ötesinde bir tümör baskılayıcı protein olduğu farkedilmiştir. Örneğin C/EBP α , p21 gen ifadesini ve protein kararlılığını artırarak hücre çoğalmasını engeller (153). C/EBP α aynı zamanda direk olarak CDK2 ve CDK4'e bağlanır, bu genlerin fonksiyonlarını ve böylece hücre döngüsünün (G1-S) ilerlemesini durdurur. Ek olarak C/EBP α , CDK2 yıkılımını artırır (154). DNA bağlanma kapasitesini engelleyen C/EBP α mutasyonları G1-S geçişini yavaşlatır, fakat granülosit farklılaşmayı uyarda yetersizdir (153). C/EBP α , E2F yolaklarını engeller ve böylelikle C-MYC ve

hücre çoğalmasını yavaşlatır (155). Böylelikle C/EBP α fonksiyonunun bozulması sadece granülositik farklılaşmayı engellemez, aynı zamanda miyeloid hücrelerin çoğalmasını sağlar.

GATA-1 megakaryositik ve eritroid serilerin gelişiminde önemli fonksiyonu olan iyi tanımlanmış bir transkripsiyon faktörüdür (156). GATA-1 megakaryositik gelişimde gerekli olduğu için megakaryoblastik lösemilerde GATA-1 mutasyonlarından şüphelenmek mantıklı görünmektedir. Down sendromlu çocuklarda çocukluk başlangıcında megakaryoblastik lösemi gelişimi riski artmaktadır. İlginçtir ki son bir çalışmada Wechsler ve arkadaşları megakaryoblastik lösemi ile ilişkili her down sendromunda GATA-1 mutasyonları bulmuştur. Down sendromlu diğer hastalarda böyle bir mutasyon bulunmamıştır (157).

RUNX1-MTG8, PML-RAR α ve diğer RAR α füzyon proteinleri baskılayıcı proteinler olarak iyi anlaşılmıştır. MLL'nin kendisi özellikle Hox gen promotorlarındaki özel DNA dizileriyle ilişkili bir aktifleştirici proteindir. MLL, Hoxc8 gen ifadesi için gereklidir. Hox lokusundaki histonlara bağlanır ve metiller (Histon H3, lizin 4). Histon metilasyonu hedef genlerin aktivasyonu ile ilişkilidir. MLL füzyon proteini proteinin N terminal bölgesine bağlanır (158). MLL füzyon proteininin bir evrensel özelliği kendilerini ve yaban tip MLL'leri dimerize edebilmeleridir. MLL füzyonları, MLL komplekslerinin Hox genlerine (ifadelerini aktive etmek için) toplanmalarını teşvik etmektedir. Hox gen ifadesi hematopoetik hücreler tarafından kendini yenilemede artışı sağlamaktadır. Ek olarak bir çalışmada MLL füzyonlarının asetilasyon ve p53 aktivasyonunu önlediği (hücre siklusu, apoptoz ve genomik kararlılığı etkileyen bir özellik) belirtilmiştir (159). Bazı MLL füzyon proteinleri aktivasyon için aktivatörlerin anormal birikimiyle Hox genlerini direk olarak hedefleyebilir. Örneğin MLL-CBP füzyonu direk olarak histon asetil transferazları hedefler (160).

HOX homeodomain proteinleri homeobox genleri tarafından kodlanan proteinlerin geniş ailesinin bir parçasıdır. HOX genleri kromozom 7,17,12 ve 2'de 4 kümede (A-D) organize olmuştur. HOX proteinleri embriyogenezde vücut aksının oluşumunda önemli rol oynar ve gelişmekte olan ve erişkin hematopoezinin önemli düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir (161,162).

Farklılaşma süreci ile ilgili olarak hematopoetik gelişme süresince HOX gen ifadesinin düzenlendiği düşünülebilir. Örneğin HOXA9 progenitör hücrelerde ifade edilmektedir, farklılaşma süreci içinde ifadesi azalmaktadır ve farklılaşmış hücrelerde tespit edilememektedir (163).

Lösemnin çoğu diğer tiplerinin HOX11, HLX, HEX, PMX1, DLX, LHX2, GBX2 ve CDX2 gibi homeobox genlerinin düzenlenmelerinin bozulmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Lökogenezdeki bu proteinlerin rolü ve fonksiyonu Owens ve Hawley tarafından değerlendirilmiştir (162).

HOX aile üyeleri aynı zamanda AML ile ilişkili kromozomal translokasyonlarla da ilişkilidir. Örneğin t(7;11) ve t(2;11) translokasyonları NUP98/HOXA9 ve NUP98/HOXD13 füzyon proteinlerini oluşturmaktadır. NUP98, nükleer kor kompleksinin bir bileşenini kodlamaktadır. Füzyon proteini, HOXA9'un homeodomaini ve NUP98'deki fenilalanin-glisin tekrarlarından oluşmaktadır (164). Füzyon proteinlerinin fazla ifadenmesi NIH3T3 hücrelerini değiştirir, miyeloid progenitör hücrelerini ölümsüzleştirir (165) ve transplante edilen farelerde AML oluşumuyla izlenen bir miyeloproliferatif hastalığı başlatabilir (166,167).

2.3.6.2. Epigenetik Değişiklikler

Kanserler DNA metilasyon durumunu değiştirir. Çoğu kanserde genomun belirli bölgelerinde eş zamanlı olarak hipermetilasyon meydana gelir (168,175). Bu durum AML'de de görülür. AML'de sıklıkla meydana gelen anormal gen metilasyonu genellikle kötü prognozla ilişkilidir (174). Hipometilasyon ilk olarak onkogenlerin aktivasyonu ile karsinogenezin bir mekanizması olarak görülmüştür (169). Hipometilasyonun aynı zamanda *in vitro* ortamda kromozomal kararsızlık ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve bu karsinogenezde rol oynayabilir (170). Diğer taraftan anormal DNA hipermetilasyonu tümör baskılayıcı genlerini susturarak karsinogeneze açıkça katkıda bulunur ve böylelikle fonksiyonel proteinlerin ifadesini durduran delesyon veya fonksiyon kaybı mutasyonuna alternatif bir mekanizma olarak önemli rol oynayabilir (168). Bazı genlerdeki hipermetilasyon yaşlanma süreci boyunca normal dokularda gözlenebilir (171). Diğer genler kanser hücrelerinde metillenir. Farklı malin hastalıklar eşsiz DNA metilasyonları

sergiler. Örneğin RB1 geni retinoblastomada sıklıkla metillenebilir (172). AML’de p15INK4B’nin promotor metilasyonu uzun süredir bilinmektedir (173) ve MDS’de bu genin metilasyonunun kötü prognozla ve AML gelişimi riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (101). AML’de sıklıkla metillenen diğer genler: p15, p16, p73, HIC1, ID4, RARβ2, DAPK, CDH1 (E-kaderin), SHP1, MGMT, FHIT, CRBP1, ER, SOCS1, WIT-1, MYOD1, PITX2, GPR37, SDC4, MEIS1, THBS1, kalsitonin’dir. Bu genlerin sadece birkaçının tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğu bilinmektedir ve bazıları da normal hematopoetik hücrelerde ifade edilmez (174).

Kromozomal translokasyonların direk sonucu olarak histon kuyruğunu modifiye eden enzimlerin anormal aktiviteleri de aynı zamanda AML’de görülebilmektedir. Bu epigenetik değişikliklerin AML gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı açıktır ve tedavi için önemli hedefler olabilir.

2.4. KÖK HÜCRELER

Canlı vücudunda uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak diğer doku hücrelerine dönüşebilen hücreler “kök hücreler” olarak bilinmektedir. Farklılaşmamış kök hücrelerin diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (kendini yenileme, selfrenewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (çoklu seriye farklılaşma, multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (176).

2.4.1. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER (MKH)

MKH’ler bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilir. Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler. Bu hücreler ilk kez Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, FCS (fötal buzağı serumu) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde yapışma yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen (Şekil 2.3) hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir (177). Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan multipotent kök hücreler olduğu, her üç germ

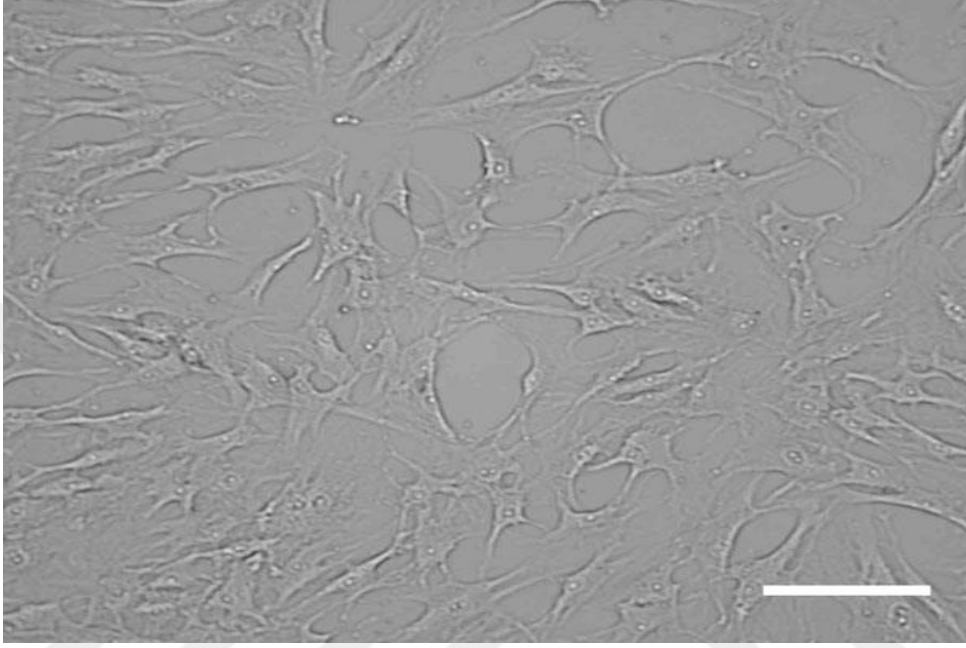
yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur (178). Önceleri, CFU-F (koloni oluşturan birim fibroblast) ve “kemik iliği stromal fibroblast”ları denilen bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/ stromal hücre olarak tanımlanmışlardır. Caplan ve Correa son zamanlarda MKH’lerin terapötik potansiyeline gönderme yaparak MKH’ler için yeni bir isim olarak kullanılan iyileştirici/tıbbi sinyal hücreleri terimini önermiştir (179,180).

Kemik iliğinden keşfedildiklerinden bu yana MKH’ler yağ dokusu (181), sinovyum (182), amniyotik sıvılar (183), perifer kan (184) endometrium ve menstrual kan (185), umbilikal kordon kanı (186) ve fetal dokular (187) gibi vücudun pratik olarak tüm dokularında bulunmuştur. Uluslararası Hücresel Terapi Derneği insan MKH’lerini tanımlamak için minimal kriterler önermiştir (188). Bu kriterler; plastiğe yapışabilme, *in vitro* ortamda osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşabilme (Şekil 2.4) ve CD105, CD73, CD90 yüzey belirteçlerinin pozitif ve CD45, CD34 ve CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR belirteçlerinin negatif ifadesini içermektedir. MKH’ler ek olarak CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e ($\alpha 5$ -integrin), HLA-1 gibi belirteçleri ifade ederler (176,189).

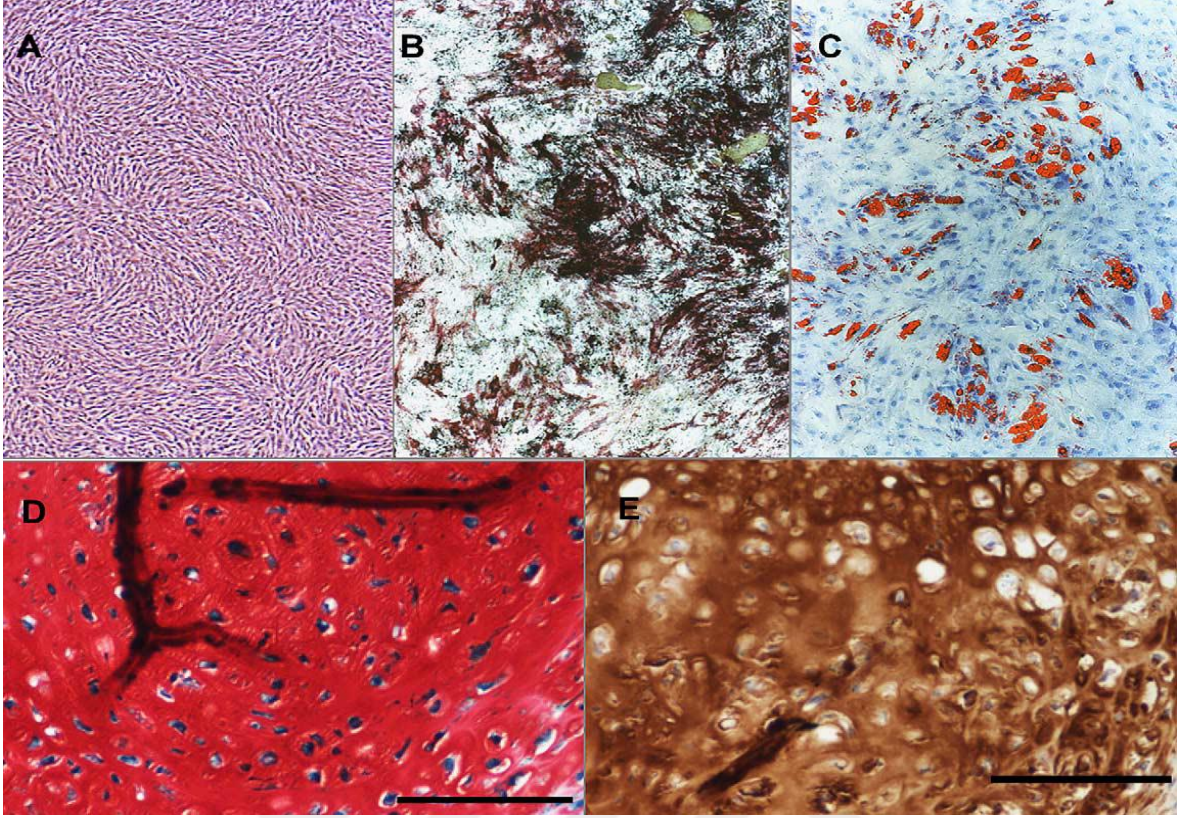
Hematopoetik mikroçevrenin ana bileşeni MKH’lerdir (190). MKH’ler fonksiyonel olarak farklı hücre tipleri ve yapıları üreterek hematopoetik mikroçevrenin ana bileşeni olarak hematopoezi desteklemede önemli rol oynarlar (18). MKH’ler kemik iliğinde HKH’ler, endotelyal hücreler, adipositler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastları içeren diğer kemik iliği hücre tipleriyle iletişim kurarlar (191). Üstelik MKH’lerin HKH göçünün düzenlenmesinde, kendini yenileme ve farklılaşmasında önemli rol oynayarak HKH nişinde önemli düzenleyici rolü olduğu bulunmuştur (18,192). Kemik iliği stromal hücrelerinin HKH büyümesi ve farklılaşmasını destekleme gözlemleri temelinde MKH’lerin kemik iliğinde HKH’lere benzer bir bölgede bulunduğu açıktır (193).

Çalışmalar paralelinde HKH’lerle zenginleştirilmiş MKH’lerin birlikte transplantasyonu engraftmanı (tutma, kök hücrelerin alıcı kemik iliğine yerleşip kan yapımına başlaması) düzeltilmiş ve graft bozukluğunu azaltmıştır (194). Benzer şekilde HKH’lerin MKH’lerle kokültürü kısıtlı derecede *ex vivo* ortamda HKH’lerin büyümesini kolaylaştırmıştır (195). Sonuç olarak osteoblastlar ve endotelyal hücreler yanısıra MKH’ler HKH nişinin önemli

bir bileşenidir. MKH'ler hematopoez boyunca fibronectin, osteopontin, CXCL12, Ang-1, trombospondin ve diğer moleküller gibi hematopoetik destekleyici moleküllerin bol miktarda üretimiyle HKH'lere destek sağlar (196). MKH'ler aynı zamanda IL-6, -7, -8, -11, -12, -14, -15, LIF, makrofaj (M)-CSF, Flt3-L ve kök hücre faktör (SCF) gibi diğer hematopoetik aktif sitokinlerin zengin kaynağıdır (197).



Şekil 2.3. İğ şeklinde ve fibroblast benzeri insan MKH'leri (198).



Şekil 2.4. MKH'lerin farklılaşma potansiyeli. Farklılaşmamış MKH'ler (A) ve osteogenik (B), adipogenik (C) ve kondrojenik (D), (E) farklılaşma. Hücre farklılaşması bu kültürlerde von kossa (B), nil kırmızısı O (C), safran O (D) ve (E) tip II kollajen için antikora özgü immünoboyamayı boyamayı takiben gözlenmiştir (199).

2.5. KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ

2.5.1. KEMİK VE KEMİK İLİĞİ

Kemik vücudun yapısı, korunumu ve hareketinde önemli rol oynar. Memeli kemiği preosteoblatlar, osteoblastlar ve osteositler gibi farklı gelişim aşamalarındaki kemik hücrelerinden, kollajen fibrillerinden, kalsiyum ve fosfat gibi minerallerden oluşmaktadır (200). Kemik boşluğu yumuşak kemik iliği ve kan damarları ile doldurulmuştur. Kemik boşluğu içinde gelişen hematopoetik hücreler olgunlaşana kadar kemik iliğinde tutulur ve daha sonra vasküler sisteme salınırlar (201). HKH'ler ve öncül hücreler kemik iliğinde stromal hücreler tarafından çevrelenmişlerdir. MKH'ler de aynı zamanda kemik boşluğunda bulunurlar ve *in vitro* ve kısmen *in vivo* ortamda kanıtlandığı üzere kondrositlere, osteoblastlara, fibroblastlara, adipositlere, endotelial hücrelere ve myositler gibi kemik iliği stromal hücre serilerinin çoğunluğunu oluşturmaktadır (160,202). Ek

olarak endotelyal hücreler aynı zamanda hemongioblastlardan ve embriyonik aşama boyunca hematopoetik ve endotelyal hücrelerin her ikisini oluşturan progenitör hücrelerden meydana gelmektedir (203). Bununla birlikte, şu ana kadar *in vivo* koşullarda MKH'lerin yerleşimi ve seriye yönlendirilmesi HKH'lerden daha az tanımlanmıştır. Osteogenez ve hematopoez arasında yakın bir ilişki vardır ve osteoblastların yalnızca iskelet gelişimi değil, aynı zamanda hematopoez düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (204,205).

2.5.2. KEMİK İLİĞİNDEKİ HKH NİŞİ

Kök hücre nişi; kök hücrelerin bulunduğu ve kendini yenilediği, yetişkin dokulardaki özel bir mikroçevresel bölgedir. Yapısal olarak niş; destekleyici hücrelerden yayılan sinyaller yanısıra kök hücreler için bir mikroçevre sağlayan destekleyici hücreler tarafından oluşturulur (206,207). HKH niş konsepti ilk olarak Schofield tarafından 1978'de kök hücrelerin bulunduğu fizyolojik olarak kısıtlı mikroçevreyi tanımlamak için önerilmiştir (208).

Kemik iliğindeki hematopoetik mikroçevre hematopoetik ve hematopoetik olmayan stromal hücrelerin heterojen popülasyonundan, bu hücrelerin biyosentetik ürünlerinden ve hematopoetik sitokinlerden oluşmaktadır (209). Hematopoetik olmayan stromal hücreler; myofibroblastları, diğer fibroblastoid hücreleri, endotelyal hücreleri, osteojenik öncülleri, adipositleri, CAR hücrelerini, perisitleri ve makrofajları içerirler. Bu hücreler proteoglikanlar ve proteoglikanların bütünü oluşturarak glikozaminoglikanlardan, kondroitin, heparin, dermatan türleri ve hyalüorik asitten oluşan ekstraselüler matriks (ECM) moleküllerini üretir (209). Ek olarak bu hücreler fibril oluşturan ve kollajen tip 1, III, IV, V ve VI gibi bazal lamina kollajenlerini üretirler. Stromal hücreleri aynı zamanda fibronektin, trombospondin, hemonektin, sialoadezin, laminin ve tenaskin glikoproteinleri gibi diğer matriks moleküllerini sentezler (210). Hematopoetik mikroçevreyi oluşturan hücreler aynı zamanda çoğu ya salgılanan veya membran bağı olan GM-CSF, G-CSF ve kök hücre faktörü (SCF) gibi hematopoetik sitokinlerin kaynağını sağlar.

HKH'lerin kemiğin endosteal yüzeyine geri dönüşü açığa kavuşturulmuş olmasına rağmen (211) HKH nişinin bulunduğu bölge, hücresel bileşimi ve HKH nişi ile ilgili moleküler

sinyaller son zamanlara kadar belirsiz kalmıştır. Memelilerde çoğunlukla hematopoetik hücrelerden oluşan kemik iliği kemik yapısı tarafından örtülmüştür. Bu hematopoetik hücrelerin bir kısmı başlıca osteoblastlar tarafından kaplanan endosteal kemik yüzeyinin yakınında bulunabilir. Bu anatomik düzenleme iki hücre tipi arasındaki karşılıklı iletişim ve HKH'leri düzenlemede osteoblastların (kemik büyümesinden sorumlu) potansiyel rolünü göstermektedir (204). Yapılan çalışmalarda HKH'lerin endosteal kemik yüzeyine bitişik bulunduğu tespit edilmiştir (211). HKH büyümesini desteklemedeki osteoblastların rolü *in vitro* kokültür deneyleriyle gösterilmiştir (212) ve genetik mutant fare modelleri kullanarak yapılan birkaç çalışmada osteoblastik hücreler HKH nişinin ana bileşeni olarak tanımlanmıştır (213-215). Bu sonuçlar HKH'leri desteklemede osteoblastların rolünü kanıtlamaktadır. Bazı hematopoetik progenitör hücrelerin kemik iliğinde sinüzoidal endotelyum ile temas halinde olduğu görülmektedir (216). Son zamanlarda sinyal lenfosit aktivasyon molekülü (SLAM) ailesinin (CD150⁺CD48⁻CD41⁻) HKH tanımlayıcı olduğu gösterilmiştir. SLAM, kemik iliği ve dalakta endotelyal hücreler yanısıra kemik yüzeyine yakın bulunmuştur (217). Sinüzoidal endotelyum ile HKH'lerin etkileşimi endotelyal hücrelerin alternatif bir niş oluşturduğunu göstermektedir. Bu nişi osteoblastik nişten ayırmak için kemik iliğindeki endotelyal hücre içeren vasküler bölge **vasküler niş** olarak adlandırılmıştır (217,218). Özet olarak kemik iliğinde HKH'leri destekleyen en az iki farklı niş tanımlanmıştır; **osteoblastik niş** ve **vasküler niş**.

2.5.2.1. Osteoblastik Niş

Kemik oluşumunda kök hücre destekleyici aktivitesi olan hücrelerin ilk direk kanıtı kültürde hematopoetik hücrelerin çoğalmasını artıran çok sayıda sitokini salgıladığı gösterilen fare ve insan osteoblast hücre hatlarının çalışmalarıyla sağlanmıştır (219). 1970'lerdeki çalışmalar farklılaşmamış hematopoetik hücrelerin endosteal kemik yüzeyine yakın bulunduğunu ve farklılaşan hücrelerin iliğin merkezi eksenine doğru hareket ettiğini göstermiştir. Kemik sert ve katı bir organ olmasına rağmen endosteal niş böyle değildir; daha ziyade esneklik sergiler ve sistemik düzenlenme altındadır. Endosteal bölgedeki nişin tanımlanmasından sonra endotelyal yüzdeki hücreler nişin hücresel bileşeni olarak önerilmiştir. Fakat, heterojen hücre popülasyonları olgun kemik hücreleri, osteoblastlar ve proosteoblastları içeren endosteal bölgede bulunmuştur (220).

HKH'lerin uzun-sürelili ve kısa sürelili olmak üzere 2 sınıfı vardır. Uzun sürelili HKH'ler aylarca, hatta hayat boyu hematopoeze katkıda bulunabilirler. Kısa sürelili HKH'lerin birkaç haftayla sınırlı yeniden oluşturma yetenekleri vardır (221). Kısa sürelili HKH'ler aktif olarak döngü geçirirken uzun sürelili HKH'ler başlıca sessiz veya yavaş döngü geçiren hücreler olarak sürdürülür. Kemik morfogenezik protein (BMP) reseptör I A (BMPRIA)'nın kondisyonel inaktivasyona uğratıldığı fare çalışmasından elde edilen veriler uzun sürelili-HKH'lerin sayısındaki artışla bağlantılı olarak trabeküler kemikteki osteoblastik hücreler alt kümesi olan iğ şeklindeki N-kaderin+CD45-osteoblastik (SNO) hücrelerin sayısında artışı ortaya koymuştur. Bu da nişin ana bileşeni olarak SNO hücrelerinin fonksiyonunun HKH'leri desteklemek olduğunu göstermektedir (213). Benzer şekilde paratiroid hormonu (PTH) ve PTH ile ilgili protein reseptörü (PTHrP) PTH/PTHrP reseptörü (PPR) transgenik fare modelinde osteoblast sayısında artış HKH'lerin sayısında paralel artışa yolaçmıştır (214). Bu çalışmaların her ikisi osteoblastik nişte uzun sürelili-HKH'lere olan bağımlılığı işaret etmektedir. Osteoblastik nişin kök hücreleri sessiz aşamada tutma yeteneklerinin yeterli kök hücre sayısının sürdürülmesinde önemli bir mekanizma olduğu görülmektedir (215). Bu çalışmalar HKH'leri destekleme ve devamlılığının sürdürülmesinde osteoblastik nişin rolünü desteklemektedir. Visnjic ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada HKH'lerin ve hematopoetik sistemin destek için osteoblastlara bağlı olduklarını kanıtlamıştır (222) Diğer bir çalışmada osteoblastların bir allojenik çevrede HKH'lerin engraftmanını kolaylaştırdığı görülmüştür (223).

2.5.2.2. Vasküler Niş

Kemik iliğinde sinüzoidal damarların endotelial hücreleri boyunca bulunan diğer bir niş çeşidi vardır. Bu mikroçevre vasküler niş olarak adlandırılmaktadır. Vasküler niş son zamanlarda tanımlanmıştır. Bu yeni tip niş SLAM aile reseptörleri kullanılarak kemik iliğindeki kök ve progenitor hücreleri ayırmak için yapılan son çalışmayla açığa çıkarılmıştır (217). Vasküler niş çoğalmayı ve farklılaşmayı artırmakta, hücre döngüsünü ve kısa sürelili HKH'leri aktive etmektedir. CD150⁺ CD48⁻ CD41⁻ Lin⁻ hücrelerini içeren çoğunluğu saflaştırılmış HKH'lerinin kan damarlarını kaplayan sinüzoidal endotelium ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu da endotelial hücrelerin HKH'ler için hücrenel bir niş oluşturduğunu göstermektedir. HKH'ler ile temas halindeki vasküler niş çevresindeki endotelial hücreler aynı zamanda HKH davranışı üzerindeki sinyallerin

devamlılığını sağlar (224). Fakat damarlanmanın kemik iliğinin merkezi bölgesine bölünmediğini akılda tutmak önemlidir ve aslında kemiğin endosteal bölgesi de aynı zamanda damarlıdır. Böylece, ilik içindeki osteoblastlar ve vasküler nişler tamamen ayrılamaz ve HKH'leri oluşturmak ve devamını sağlamak için birlikte fonksiyon gösterirler (225).

Niş içindeki HKH'leri düzenlemeyle ilişkili olan moleküller büyük ölçüde tanımlanamamıştır. Bununla birlikte hematopoetik progenitor hücre (HPH)'lerin endotelial yüzeye toplanmasıyla ilgili yapılan çalışmalar vasküler niş ile ilgili olarak HKH davranışlarını anlamada önemli bilgi sağlamıştır. Vasküler nişin, HKH'lerin nişten hareket ederek dolaşıma girmesi, nişe geri dönmesi ve engraftmanı için önemli olan faktörleri ürettiği görülmüştür. Vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM1) ifade eden endotelial hücreler SDF-1 ve FGF4 gibi kemotaksik faktörlere yanıt olarak VLA-4 ile megakaryositler ve progenitörleriyle yakın ilişki halindedir; böylece bu hücreler megakaryosit olgunlaşması ve trombosit üretimi için bir niş sağlar (226). HPH'lerin vasküler nişe toplanması FGF-4 ve CXCL12 gibi kemokinlere bağlıdır (218,226). SDF-1, CD41⁺ megakaryositlerin transendotelial göçü için güçlü bir kemotaksik faktörken FGF-4 megakaryosit progenitörlerinin vasküler nişe yapışmasını artırır. FGF-4 ve SDF-1 endotelial hücrelerde VCAM-1 yanısıra megakaryositlerde VLA-4 adezyon molekülünün ifadesini artırır.

HKH'ler aynı zamanda FGFR1, -2 ve -3 ifade eder ve FGF'nin *in vitro* ortamda HKH kendini yenilemesi ve çoğalmasını uyarabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle vasküler nişten yayılan FGF sinyallerinin osteoblastik nişten (daha düşük FGF ifadesi) vasküler nişe (daha yüksek FGF ifadesi) bir eğim oluşturarak HKH'lerin/HPH'lerin toplanmasında rol oynaması mümkündür. FGF'nin bu düzenleyici rolü embriyonik gelişim boyunca hücre göçünü uyarabilme yeteneğiyle uyumludur (227).

Hematopoez ve damarlanma gelişim boyunca eş zamanlı olarak meydana gelir. Aslında HKH'ler ve endotelial hücreler embriyonik aşamada aynı progenitör hücrelerden (hemangioblastlar) köken almaktadırlar ve vitellüs kesesi, aort-gonad-mezonefroz, plasenta, fetal karaciğer, dalak ve erişkin kemik iliğinde meydana gelen hematopoez gelişimiyle yakından ilişkilidir (203,228). Gerçekten de SLAM belirteçlerini ifade eden HKH'ler

sinüzoidal endotelyal hücrelere bitişik olmanın yanısıra trabeküler kemiğin osteoblastik yüzeyinde de tespit edilmiştir (217). Bu gözlemler HKH'lerin farklı koşullar altında niş olarak osteoblastları ve endotelyal hücreleri kullandığını göstermektedir. Sinüzoidal endotelyal hücrelerin osteoblastik niş olarak bilinen nişle birlikte alternatif bir HKH nişinin bir parçası olarak görev yapma potansiyelinin olmasının keşfi sessiz bir mikroçevre sağlayan osteoblastik niş ve çoğalma ve farklılaşmayı teşvik eden vasküler niş olarak daha önceden önerilen modeli desteklemektedir (218).

Diğer çalışmalar da HKH sessizliğinin sürdürülmesinin sağlanmasında osteoblastların daha belirgin rol oynadığını desteklemektedir ve olgun kan hücrelerinin nihayetinde perifer dolaşıma salındığı yer olan sinüzoidal endotelyumun yüksek konsantrasyonlu oksijen ve büyüme faktörlü, besin açısından daha zengin mikroçevre sağlayarak kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik ettiğini göstermektedir (218,229). Vasküler nişin ikinci fonksiyonu; nişten ayrılma (mobilizasyon) ve nişe geri dönüşün (homing) her ikisi boyunca önemli olan HKH'lerin transendotelyal göçüne yardımcı olmaktır (230). Vasküler nişin üçüncü fonksiyonu, kemik iliği nişi stres altındayken kemik iliği nişinin yenilenmesinde görev yapabilesidir (217).

2.5.2.3. Osteoblastik ve Vasküler Niş Arasındaki İlişki

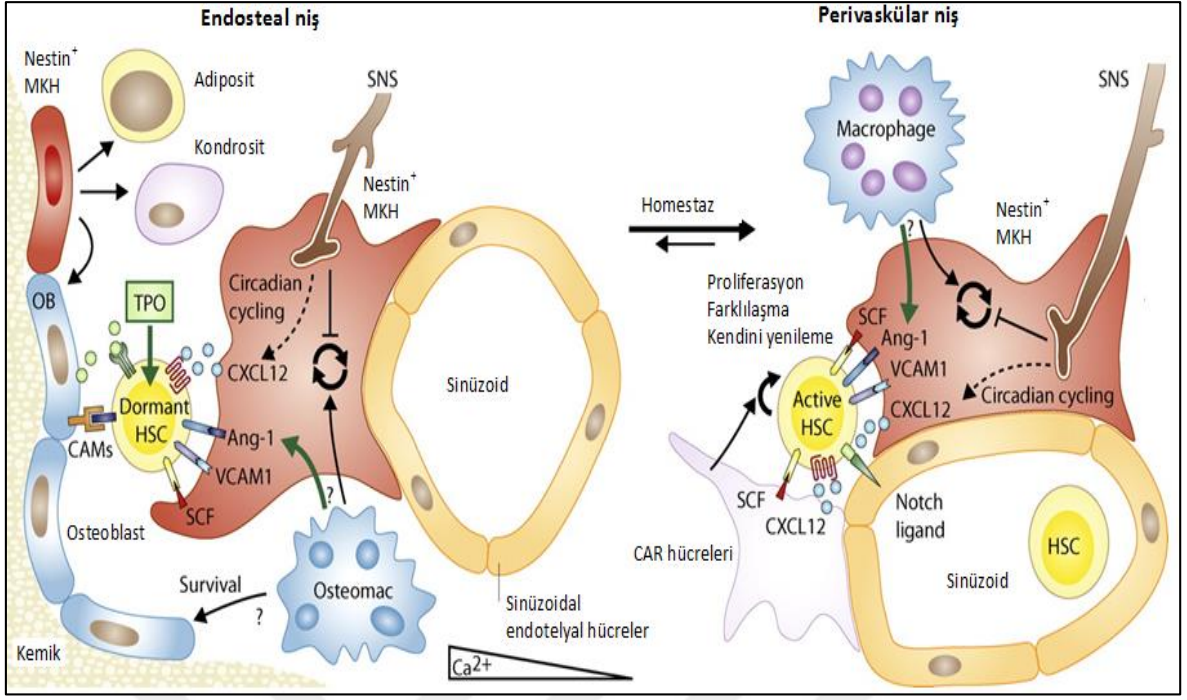
Hücre yüzey reseptörlerinin bir ailesi olan SLAM ile *in vivo* immünfloresan çalışmasına dayanarak Kiel ve Morrison bazı dokularda aynı zamanda sinüzoidal endotelyal niş olarak da bilinen HKH'lerin vasküler nişini tanımlamıştır (231) HKH'lerin nişlerinin bu iki çeşidi anatomik ve fonksiyonel olarak tanımlanmasına rağmen elde edilen veriler endosteal ve vasküler nişin hem konum ve hem de fonksiyon olarak örtüştüğünü göstermektedir. Üç boyutlu görüntüleme çalışmaları trabeküler kemiklerin yüzeylerinde bol miktarda vasküler yapılar bulunduğunu, bu damarların ve endosteal yüzeylerin trabeküler bölge içinde birbirleriyle çok yakından bağlantılı olduğunu tespit etmiştir (232).

Kemik boşluğunun iç yüzeyinde bol miktarda osteoblastların bulunduğu osteoblastik niş, sessiz aşamada uzun süreli HKH depolanması için bir havuz olarak görev yapabilirken, kan damarlarını kaplayan sinüzoidal endotelyal hücrelerden oluşan vasküler niş kısa süreli HKH çoğalması ve farklılaşması için bir çevre sağlar. Her iki niş de hematopoetik

hemostazı sürdürmek veya hasardan sonra hematopoezi yenilemek için birlikte iş görür (233).

Osteoblastik ve vasküler niş arasındaki fonksiyonel farklılık henüz aydınlatılmıştır. Bu iki mikroçevre arasındaki başlıca farklılıklardan birincisi oksijen düzeyidir. Vasküler nişte osteoblastik nişe göre oksijen düzeyi daha yüksektir. Böyle bir mikroçevre altında kök hücrelerin hücre döngüsü devam etmektedir (234). Bölgesel hipoksi altında G0 aşamasında osteoblastik nişte bulunan HKH'ler belirli bir zamanda vasküler nişe hareket edebilirler, farklılaşma geçirebilirler ve olgun hücrelerin perifer kan akışına gereken miktarını karşılayabilirler (235). Kaynak miktar gerekli olgun hücreleri karşıladığında vasküler nişteki HKH'ler G0 aşamada tekrar devamlılıklarının sürdürüldüğü yer olan osteoblastik nişe geri hareket eder.

Endosteal nişteki sessiz HKH'ler her ikisi de CXCL12, SCF, angiopoetin-1 (Ang-1), VCAM-1 ve trombopoietin (TPO) gibi HKH devamlılığı ve sessizliğini sağlayan faktörlerin kaynağı olan osteoblastlar (OB) ve nestin⁺ MKH'lerle oldukça yakın temas halindedir. Osteoblastlar (OB) ve nestin⁺ MKH'ler HKH'leri bu niş kısmında tutmak için birlikte görev yaparlar. Perivasküler niş endosteumdan daha uzaktadır ve osteoblastları içermez, fakat aktif HKH'lerin kendini yenilemesini artıran faktörler salgılayan perivasküler CAR hücrelerini içerirler. Kendini yenileme aynı zamanda sinüzoidal endotel hücreleri tarafından ifade edilen Notch ligandları tarafından uyarılır. Her iki niş ana bileşen olarak perivasküler nestin⁺ MKH'ler içerir. Fagositlerin çeşitli alttipleri osteoblastların (osteomaklar) devamlılığını ve MKH'lerin (makrofajlar) devamlılığı ve çoğalmasını desteklerler. Aynı zamanda HKH devamlılığını sağlayan faktörlerin ifadesini uyarır. Sempatik sinir sistemi (SNS) MKH çoğalmasını önler ve CXCL12 ifadesinin sirkadyan döngüsünü tetikler (Şekil 2.5) (236).



Şekil 2.5. Kemikteki endosteal ve perivasküler HKH nişi (236).

2.5.3. MDS VE AML'DE KEMİK İLİĞİ MİKROÇEVRESİ

MDS patolojisindeki en önemli olayın HKH/HPH'lerdeki moleküler bir anormallik olduğu görünmesine rağmen yetersiz hematopoez aynı zamanda değişen hematopoetik-stromal etkileşimler, büyüme faktörleri ve hematopoetik düzenleyicilerin üretimindeki değişiklikler gibi kemik iliği mikroçevresindeki anormalliklerden de kaynaklanabilmektedir. MDS klonal bir kök hücre bozukluğudur, fakat hematopoezin düzenlenmesi mikroçevrenin fonksiyonuna bağlı olduğu için MDS patofizyolojisinde mikroçevrenin rolü ile ilgili sorular da artmaktadır. Düşük risk MDS'nin başlıca özelliği apoptozda artış iken yüksek risk MDS'de apoptozda azalma görülmektedir. Yapılan çalışmalar MDS'li hastada sitokinlerin anormal ifadesini ve kemik iliği mikroçevresindeki sinyalleri düzenleyen apoptozda artışı göstermiştir. MDS'li hastaların bir kısmında AML'ye ilerlemenin görülmesi lösemiye dönüşümde hematopoetik mikroçevrenin potansiyel katkısını gösterme çalışmaları için bu hastalığı uygun bir model kılmaktadır (237).

Son birkaç yılda yapılan araştırmalardan elde edilen kanıtlar hematolojik malignitelerin patofizyolojisinde kemik iliği mikroçevresi anormalliklerinin ilişkisini açıkça

göstermektedir. Nişin hücrel bileşenleriyle ilişkili yayınlanan verilerin çoğunluğu niş hücrelerinin değişiklik gösterdiğini kanıtlamıştır. Walkley ve ark. kemik iliği mikroçevresinde retinoblastoma geninin (RB) delesyonunun farede prelösemik miyeloproliferatif hastalık gelişimine katkıda bulunduğunu kanıtlamıştır. Bu araştırmada Walkley ve arkadaşları bu durumun miyeloid hücreler ve mikroçevre arasındaki etkileşimin sonucu olduğunu gösterdiler. Hastalığı başlatan etken hematopoetik hücreler ve mikroçevrenin her ikisinde de bulunmalıydı. Hücre döngüsünün merkezi düzenleyicisi ve tümör baskılayıcı olan RB'nin aktivasyonunun bozulması farelerin hematopoetik sisteminde ekstramedülar hematopoeze ve miyeloproliferatif hastalığa yolaçmıştır. Fakat RB'nin miyeloid kaybı miyeloproliferatif hastalığı veya HKH anormalliklerini başlatamamıştır. RB mutantlarında miyeloproliferatif benzeri hastalık hematopoetik hücreler ve kemik iliği mikroçevresi arasındaki bozulan etkileşimler sonucu oluşmuştur (238).

Bir başka çalışmada aynı grup farede Retinoik Asit Reseptör γ (RAR γ) delesyonunun kronik miyeloproliferatif bozukluğa yol açtığını rapor etmiştir. Transplant çalışmaları RAR γ -hematopoetik hücrelerin normal fareye transplante edildiğinde normal olarak fonksiyon gösterdiğini açığa çıkarmıştır. Fakat normal hematopoetik hücrelerin RAR γ -mikroçevreye transplantasyonu, transplante edilen hücrelerde miyeloproliferatif bozukluğa yol açmıştır (239). Bu çalışmalar hematopoetik mikroçevredeki bir anormalliğin miyeloproliferaif bozukluğu oluşturmak için yeterli olabildiğini göstermiştir.

Fare modellerinden faydalanılarak yapılan son keşifler hematopoetik mikroçevrede lökomogeneze katkıda bulunan veya lökomogenez için gerekli olan genetik değişiklikler için ilk deneysel kanıtı sağlamıştır. Raaijmakers ve arkadaşları transgenik fare modeli kullanarak hematopoetik mikroçevredeki genetik değişikliğin yetersiz hematopoezli ve şekli bozulan hematopoetik hücreli ve arasına AML'ye transformasyon gösterebilen MDS'yi tetiklediğini göstermiştir (19). Raaijmakers ve ekibi ilk kez endosteal niş bozulmasının MDS'ye yolaçabileceğine dair kanıt sağlamıştır. Araştırmacı mezenkimal osteodizin hücrelerinin alttıplerindeki birkaç gen ürününü değiştirmek için DICER1 gen delesyonunu gerçekleştirmiştir.

DICER1 mikroRNA biyogenezi için (240) gerekli olan bir RNAz III endonükleazdır. Fare osteoprogenitörlerinde (fakat olgun OB deyil) DICER1'in delesyonu hematopoezin bütünlüğünü bozmuştur. Osteoklast sayısı ve fonksiyonu etkilenmemesine rağmen osteoblast sayısı önemli şekilde azalmıştır. DICER1 delesyonuyla miRNA olgunlaşmasının baskılanması hücrel transformasyonu ve tümörigenezi artırmıştır. Bu fareler MDS'nin belirtileri olan hiperplastik kemik iliği ve dismiyelopoezli fatal nötropeni geliştirmiştir. Yaban tip alıcı fareye transplante edildiğinde bu MDS hücreleri hastalığı ilerletmemiştir. Aksine DICER *knock-out* fareler yaban tip farelerdeki kemik iliği hücreleriyle yeniden oluşturulduğunda bu fareler MDS geliştirmiştir. Bu sonuç HKH/HPH'lerin MDS fenotipi edinmesinde nişin önemli rolünü göstermektedir.

Genetik fare modelleri kemik iliği nişinin kritik rolünü güçlü bir şekilde göstermesine rağmen bu bulguların insan MDS'unda görülmesi oldukça tartışmalıdır. Fakat ilginçtir ki bir insan çalışmasında MDS hastalarından izole edilen MKH'ler aynı zamanda miRNA ifadesinin global azalması yanısıra DICER1 ve diğer RNA III endonükleaz olan DROSHA'nın düşük ifadesini göstermiştir (241). Son bir çalışma hasta kökenli stromal hücrelerinin *in vivo* ortamda insan MDS kök hücrelerinin idamesinde önemli rolünün olduğu görüşünün ilk kanıtını sağlamıştır (242). Gerçekten de araştırmacılar hasta kökenli CD34⁺ hücrelerin ve immün uyumlu farelerin kemik iliği boşluğuna MKH/MPH'lerin birlikte enjeksiyonunun farklı genetik yapıdaki düşük risk MDS vaka grubunda kuvvetli miyeloid eğilim ve klonaliteyle gösterildiği gibi MDS hücrelerinin uzun dönem ve önemli engraftmanına yol açtığını göstermişlerdir (243). Araştırmacılar aynı zamanda hücrel sinyal yollarının bileşenlerinin birbirini etkilemesiyle ilişkili bazı süreçlerin MDS MKH'lerinde bozulmuş olduğuna dair deneysel kanıtları sağlamıştır. Birlikte değerlendirildiğinde bu veriler stromal niş elementlerinin muhtemelen MDS patogenezi katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Yapılan bazı çalışmalar MDS hastalarının kemik iliğinde osteoprogenitörlerin ve MKH'lerin normal morfoloji ve sıklığının yanısıra *in vitro* ortamda bozulmayan osteoblastik, adipositik ve kondrositik farklılaşma potansiyeli gösterdiğini kanıtlamıştır (244). Benzer şekilde MDS-MKH'lerinin MDS kökenli HKH'lerin *in vitro* büyümesini desteklediği rapor edilmiştir (244,245). Aksine diğer gruplar azalan osteojenik farklılaşma

ve uzun-dönem kültür başlatıcı hücre denemelerinde hematopoezi düşük destekleme yeteneğini kanıtlamıştır (246,247).

Bazı araştırmacılar MDS-MKH'lerinin CD90 ve CD105'in önemli derecede düşük ifade düzeyini öne sürmüştür (248,249). Aksine bazı çalışmalarda MKH'lerin ve kollajen tip-1'in etkileşiminde ikişkili bir integrin olan CD49b yüksek düzeyde ifade edilmiştir (245,250). Bunun dışında MDS'deki MKH'ler CXCL12'nin daha yüksek ifadesini göstermiştir (251).

Birkaç çalışmada farklı hematolojik hastaların MKH'lerinde önemli kantitatif ve fonksiyonel değişiklikler meydana geldiği öne sürülmüştür (245,252). Miyeloproliferatif hastalıklarda megakaryosit ve makrofajların PDGF, FGF ve TGF α sitokinlerini salgılayarak fibrotik reaksiyon patogeneğinde önemli rol oynadıkları görülmüştür (253). MDS'de MKH'ler TNF α düzeylerinde değişiklikler göstermiştir (254).

MDS'li hastalarda kromozom 1 ve 7'nin MKH'lerdeki yapısal anormalliklerde daha sık olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir ve MKH'lerdeki anormallikler ve tam sağkalım arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (255). MDS-MKH'lerindeki kromozomal anormalliklerin (çoğunlukla anöploidi) varlığının AURKA ve AURKB genlerinin değişen ifadesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (256). Böylece MDS-MKH'lerindeki genetik anormalliklerin varlığı kemik iliği mikroçevresinin genetik kararsızlığının malin hücrelerin çoğalmasını kolaylaştırabileceği ve böylelikle lökomogenezin özel bir düzenleyicisi olabileceğini göstermektedir.

Hematopoetik nişin bozulmasına katkıda bulunabilen diğer önemli hücrenel bileşenler monosit ve makrofajlardır. MDS kökenli monositler stromal sinyallere anormal şekilde yanıt vermiştir. Aslında MDS'li hastaların monositleri klonal HKH'lerinden köken almaktadır ve stromal sinyallere karşılık olarak matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) gen ifadesini artırmada başarısızdır (257). MMP-9 mikroçevreden SDF-1'in ayrılmasında ilişkilidir ve hematopoetik hücrelerin kemik iliğinden perifer kana geçişini kolaylaştırmaktadır (235). Hücrelerin kemik iliğinden çıkışını kolaylaştırmada MMP-9'un rolü dikkate alındığında MMP-9'un tetiklenebilir düzeyleri azalırken duyarlı olmayan monositlerin birikmesini ve böylelikle MDS'li hastaların kemik iliğinde çok hücreliliğe

(hiperselülerite) yol açmasını varsaymak mantıklıdır. MDS'de makrofajlar TNF- α 'nın artan senteziyle MKH'ler ve hematopoetik progenitörler arasındaki normal etkileşimi engelleyebilmektedir (258). Açıkçası MDS'de bu yolları tetikleyen aktivitelerin yanısıra stromal hücreler, makrofajlar ve HKH'ler arasında değişen yanıtta sorumlu olan sinyal yollarının daha iyi tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

Marcondes ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada MDS'li hastalardan elde edilen MKH'lerin, MDS'nin daha ileriki aşamalarının aksine sağlıklı kontrollerden 14-17 kat daha yüksek düzeyde IL-32 ifade ettiğini kanıtlamıştır ve bu yüksek IL-32 ifadesi MDS hücrelerinde yetersiz hematopoezi ve MDS iliğinde aşırı apoptozu yeniden oluşturarak MDS hücrelerinde apoptozu artırmıştır (259). Bu bulgular stroma tarafından üretilen IL-32'nin MDS patofizyolojisine katkıda bulunabileceği ve terapötik bir hedef olarak görev yapabileceğini göstermektedir.

MDS patogenezinde MKH'lerdeki bozulan Wnt sinyalinin etkisi belirsizdir. Wnt antagonistlerini kodlayan genlerin MDS'li hastalarda hipermetile olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç metilasyon durumu ve lösemi gelişim riski arasındaki direk bir bağlantı olduğunu göstermektedir (260). Wnt sinyalinin bozulması sadece HKH'leri etkilemez, aynı zamanda kemik iliği nişini de etkilemektedir. Osteoblastlardaki Wnt inhibitörlerinin aşırı ifadelmesi trabeküler kemikte azalmayla niş yapısını değiştirerek ve hematopoetik progenitör hücrelerinin kemik iliği içindeki yerleşimini ve fonksiyonunu azaltarak ikili bir etki sergilemektedir (261). Osteoblastlarda β -katenini aktive edici mutasyonlar aynı zamanda MDS hastalarında da bulunmuştur (262). Stromal ve hematopoetik sinyal yollarının bu net bağlantısı patolojik niş-hematopoetik hücre etkileşimini bozmayı amaçlayan yeni stratejileri geliştirme ihtiyacını vurgulamaktadır.

AML kök hücre veya progenitör hücrelerde kontrolsüz büyümeye yolaçan genetik anormallikler serisinden meydana gelir. Geçen yıllardan elde edilen veriler hematolojik malignitelerin patogenezinde hematopoetik mikroçevrenin ilişkili olduğunu göstermiştir (7). Mikroçevresel değişikliklerin kök hücre hareketliliğinde artışa ve alternatif niş oluşumuna yol açarak lösemide önemli ve patojenik olabileceğine dair kanıtlar artmaktadır (263). AML anormal bir hematopoetik mikroçevrede oluşabilir. Elde edilen son veriler hematopoetik sistemde lösemik olayların paralelinde nişin hücre çoğalması ve büyümesi

lehine baskın sinyalli bir çevreye dönüştürüldüğünü işaret etmektedir. Bazı durumlarda bu olayların birleşimi gerekebilir (264). Böylece lösemi kök hücreleri (LKH) yaşamak için kemik iliği nişinin desteğini alabilir ve daha sonra çoğalmayı artıran sinyalleriyle kemik iliği nişinin düzenlenmesinin bozulmasında etkili olabilirler. Normal kök hücrelerin sessizliğini sürdüren moleküler mekanizmalar aynı zamanda LKH'lerin sağkalımına da olanak sağlayabilir. LKH sağkalımı, çoğalması ve farklılaşması için osteoblastik ve vasküler nişlerin her ikisi de kritik öneme sahiptir (213-215,217). LKH'ler HKH'lerle kendini yenileme ve farklılaşma gibi belli özellikleri paylaşırken LKH'lerin çoğalmaları, istila etme ve yayılma yetenekleri farklıdır. LKH'ler malin klonun devamlılığı için gerekli yer olan kemik iliği mikroçevresi içinde uzun-süreli kendini yenileme (265) kapasitesi sergiler. LKH'ler lösemik blastları oluşturabilirler ve lösemik klon bir hiyerarşi olarak organize edilmiştir (213). LKH'ler homeostatik mekanizmayı kullanabilir, kemoterapi boyunca hematopetik mikroçevre içine sığınabilirler ve sonuç olarak hastalığın nüksedişine katkıda bulunurlar (266). MKH'ler LKH'lere gerekli sitokinleri ve hücre kontağıyla sağlanan sinyalleri sağlayarak lösemik hücrelerin büyümesini, yaşamasını ve ilaç direncini artırabilir (267).

Kemik iliği nişinin bozulduğu lösemi hastalarında normal hematopoezin yok olduğu kanıtlanmıştır (268). Her iki niş LKH'lerin sağkalımında, çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Ninomiya ve arkadaşları insan lösemi hücreleri ve kordon kanı CD34⁺ hücrelerinin nişe geri dönüşü, çoğalma ve sağkalım bölgelerini modellemiştir (269). Transplante edilen lösemi hücreleri başlangıçta epifiz bölgesindeki osteoblastların yüzeyine yerleşmiş, daha sonra iç vasküler ve diyafizyal bölgelere doğru çoğalmıştır. Transplantasyondan 8 hafta sonra lösemi hücrelerinin sayısı özellikle epifiz bölgesinde %50 kadar artmıştır. Yüksek doz sitarabinden sonra kalan lösemi hücreleri kümelenmiş ve endosteum yanısıra kan damarlarına yapışmıştır. Bu da lösemi hücrelerinin yalnızca osteoblastlardan antiapoptopik sinyal almadığı, aynı zamanda vasküler endotelyumdan da antiapoptopik sinyaller aldığını göstermiştir (269). Normal HKH'lerin sessizliğini sürdüren moleküler mekanizmalar aynı zamanda LKH'lerin sağkalımını kolaylaştırmaktadır.

Hematopoetik hücrelerin rejenerasyonuna benzer şekilde lösemik hücreler aynı zamanda çoğalmalarını ve yayılma potansiyellerini desteklemek için osteoblastik ve vasküler nişler tarafından iletilen sinyallerden faydalanırlar. Osteoblastlar, osteoblastik nişe CXCR4 ifade eden LKH'lerin göçünü uyaran osteopontin ve SDF-1 kaynağını temin eder. Lösemik progenitör hücrelerindeki SDF-1 ve reseptörü arasındaki etkileşim kemik iliği mikroçevresine lösemik progenitör hücrelerinin yerleşmesine katkıda bulunur. Yapılan bir araştırmada AML hastalarının kemik iliğinde anjiyogenezin seviyesinde artış rapor edilmiştir (270). VEGF yeni kan damarlarının oluşumunu teşvik eden bir hipoksi-uyarıcı büyüme faktörüdür. Hipoksiye bir yanıt olarak yeni damarlar anjiyogenezle oluşturulur ve endotel hücrelerinin çoğalması uyarılır. IL-6, IL-3, G-CSF, GM-CSF ve nitrik oksit (NO) gibi sitokinlerin salınımıyla (271) endotel hücrelerin lösemik hücrelerinin çoğalmasını artırdığı görülmüştür. Bu da aktifleşen anjiyogenik endotel hücrelerin parakrin sinyallerle lösemi hücre büyümesine yol açabileceğini göstermektedir. Kemik iliği niş fonksiyon bozukluğu çoğalmayı artıran ve/veya apoptozu önleyen bol büyüme faktörlerini sağlayarak lökomogeneze katkıda bulunabilir (272). MKH'lerin apoptozu tetikledikleri ve kemoterapi ile başlatılan hücre ölümünü zayıflattığı için AML'de rolü olabilir (273).

Normal hematopoezin baskılanması göreceli olarak düşük tümör yüklü lösemi hastalarında sıkça gözlemlenir. Lösemik hücre büyümesinin normal kemik iliği nişlerini bozduğu ve bir tümör mikroçevresi oluşturduğu kanıtlanmıştır (268).

Löseminin başlangıcında hematopoetik mikroçevrenin önemli rolü fosfataz ve tensin homolog (PTEN) eksik olan farede çalışılarak gösterilmiştir (274). HKH ve hematopoetik mikroçevredeki PTEN eksikliği lösemi/lenfoma'ya dönüşen miyeloproliferasyona yol açmıştır. Fakat yaban tip hematopoetik mikroçevre varlığında HKH'lerdeki PTEN delesyonu, miyeloproliferasyon veya lösemi gelişimi kanıtı olmaksızın HKH tükenmesini artırmıştır. Bu sonuçlar HKH'lerdeki PTEN eksikliğinin yalnızca malin transformasyon için yeterli olmadığını göstermektedir.

Son zamanlara kadar hematolojik neoplazmların patogenezindeki primer stromal anormalliklerin rolünü destekleyen çok az kanıt bulunmaktaydı. Bazı bağımsız çalışmalar lösemi hastalarının stromasındaki genomik değişikliklerin varlığını kanıtlamıştır (244,275,276). Farklı gruplar hipodiploidi, dengeli ve dengesiz translokasyonlar, tüm

kromozom kazanımı ve delesyonları gibi anormalliklerin geniş değişkenliğini göstermiştir. MKH'lerdeki tüm sitogenetik belirteçler HKH'lerde tanımlanan tekrarlayan değişiklikler değildir. Bu bulgular lösemideki MKH'lerin genetik kararsızlığındaki artışı göstermektedir ve bu hastalıkların patofizyolojisinde MKH'lerin potansiyel ilişkisini işaret etmektedir (275). Son zamanlarda Lopez-Villar ve arkadaşları array temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon ve floresan in situ hibridizasyonla MDS hastalarının MKH'lerinde bazıları özellikle MDS alttipi olan 5q sendromuyla bağlantılı olan sitogenetik değişikliklerin bulunduğunu rapor etmiştir (276).

Bu veriler MDS ve AML hastalarındaki MKH'lerde önemli fonksiyonel anormallikler, genetik ve epigenetik değişiklikler olduğunu göstermektedir. Tek bir hücredeki genetik ve epigenetik değişiklik serileri onkogenез için gerekli olmasına rağmen yeterli olmayabilir ve mikroçevrenin malignitenin oluşması için gerekli olduğu öngörülmektedir.

2.6. MİKORNA

MikroRNA'lar hayvanlarda, bitkilerde ve tek hücreli ökaryotlarda transkripsiyonal baskılama ve protein-kodlayan mRNA'nın yıkılmasıyla gen ifadesini engelleyen 21-23 nükleotid uzunluğundaki küçük kodlamayan tek iplikli RNA'ların bir sınıfıdır (240).

2.6.1. MİKORNA'LARIN KEŞFİ

1993 yılına kadar mikroRNA'ların (miRNA) varlığı ve önemi bilinmemekteydi. *Ceanorhabditis elegans* adlı nematodda, *lin-14* geninin (larval dönemin zamana bağlı gelişimi ve düzenlenmesini kontrol eden genlerden biri) fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların varlığında, yetişkin yapılarında çeşitli bozukluklar ve larval gelişimde sorunlar olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarla, gelişimsel öneme sahip bir başka gen olan *lin-4* geninin, *lin-14* geninin düzenlenmesinde etkin olduğu ortaya çıkartılmıştır (277). Lee ve arkadaşları "open reading frame" olarak kabul edilen kısımda bölgeye özgü mutagenез yoluyla elde edilen mutasyonların *lin-4* geninin fonksiyonunu değiştirmediğini ortaya koymuşlar ve *lin-4* geninin protein kodlamadığı sonucuna varmışlardır. Çalışmada elde edilen RNA'lardan birinin 22 nükleotid, diğerinin ise 61 nükleotid uzunluğunda olduğu gözlenmiştir. Uzun olan RNA'nın sap kısmından ilmik oluşturacak şekilde kıvrılmış yapıda (stem-loop) olduğu ve kısa olan RNA'nın öncülü olabileceği tahmin edilmiştir

(278). Wightman ve arkadaşları, *lin-14* geninin transkripsiyon sonrası aşamada baskılanabileceğini ve 3' UTR bölgesinin bu baskılanmada tek başına yeterli rol oynayabileceğini bulmuşlardır. Çalışmalar sonucunda *lin-4* geni RNA'larının *lin-14* geni 3' UTR bölgesindeki çeşitli alanlara komplementer olduğu ve bu durumun *lin-4* gen ürünü ile *lin-14* ifadesinin baskılanması şeklinde ortaya çıktığı vurgulanmıştır (277,278).

Lin-4 geninin keşfinden sonra 7 yıl boyunca nematodlarda ve başka canlılarda “kodlanmayan RNA’lar” ile ilgili herhangi bir bilgi açığa çıkarılamamıştır. 2000 yılında yine *C. elegans*'ın gelişimsel zamanlamasını kontrol eden genlerden biri olan *let-7* keşfedilmiştir. *Let-7* geni de yaklaşık 22 nükleotidlik bir RNA kodlamakta ve bu RNA, tıpkı *lin-4*'de olduğu gibi, nematodun geç larval evreden yetişkin hale geçmesinde, yani gelişimin zamansal kontrolünde etkili olmaktadır. *Let-7* geninin larval gelişimde etkili olan *lin-41* geninin 3' UTR bölgesi üzerinde iki farklı yere komplementer olduğu gözlenmiştir (Reinhart vd., 2000). Daha sonra yapılan çalışmalarda *lin-4* geninin aksine *let-7* geninin evrimsel olarak, sinekten insana kadar uzanan farklı türler arasında korunduğu anlaşılmış ve kodlanmayan RNA'ların diğer organizmalarda da önemli olabileceğine dair ilk bulgular elde edilmiştir. Örneğin insanlarda, içlerinde beyin, timüs, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak gibi organların da olduğu pek çok dokuda farklı ifade düzeylerinde tespit edilmiştir (279).

Larval gelişimin zamansal kontrolündeki rolleri nedeniyle *lin-4* ve *let-7* gibi genler öncelikli olarak “small temporal RNA” (küçük zamansal RNA'lar) (stRNA) olarak adlandırılmışlardır. Bununla birlikte bir yıl gibi bir süre içerisinde, insan, hayvan ve sinek hücrelerinde küçük RNA'ları klonlayan üç farklı laboratuvarında yaklaşık 100'ün üzerinde gen bulunmuş ve *Drosophila*'da 20, insanda 30, solucanlarda 60 yeni kodlanmayan RNA ile ilgili gen tespit edilmiştir. Bu genlerden ilmi bir öncül yapıya sahip RNA sentezlenmektedir ve bu RNA'lar *lin-4* ve *let-7*'ye yapısal olarak benzemektedir. Pek çoğunun sadece değişik gelişimsel evreler sırasında ifade edilmediği, daha çok belirli hücre tiplerinde belirli genlerin ifade edildikleri fark edilmiştir. Böylece, bu fonksiyonları tam olarak anlaşılamayan yapılar için “mikroRNA (miRNA)” ifadesi kullanılmaya başlanmıştır (280).

2.6.2. MİKRORNA'LARIN BİYOGENEZİ

miRNA'lar, üç aşamada oluşurlar. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür ve son adımda sitoplazma içinde olgun miRNA'ların oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.6) (281).

miRNA'lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), şapka (cap) ve poly (A) kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan DROSHA ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA'ya dönüştürülür. Çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha ve bir nükleaz olan DROSHA'nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci (microprocessor) kompleks adı verilir (282).

Pre-miRNA exportin 5 (taşıma reseptörü) ve RAN-GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (283). Sonrasında, pre-miRNA'lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden DICER adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA dubleksine çevrilir (284). DICER, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu da başlatır (285). DICER, pre-miRNA'nın sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA:miRNA dubleksinden sadece biri oluşan RISC'e dahil olur. RISC içinde yer alan bir RNaz olan Argonatin (AGO) etkisiyle iki iplikten daha kararlı olanı (genelde 5' ucu) seçilip komplekse dahil edilir (kılavuz iplik). Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. mikroRNA'lar RISC kompleksine dahil olduktan sonra AGO proteinleri yardımıyla mRNA'nın yıkımına veya translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (286).

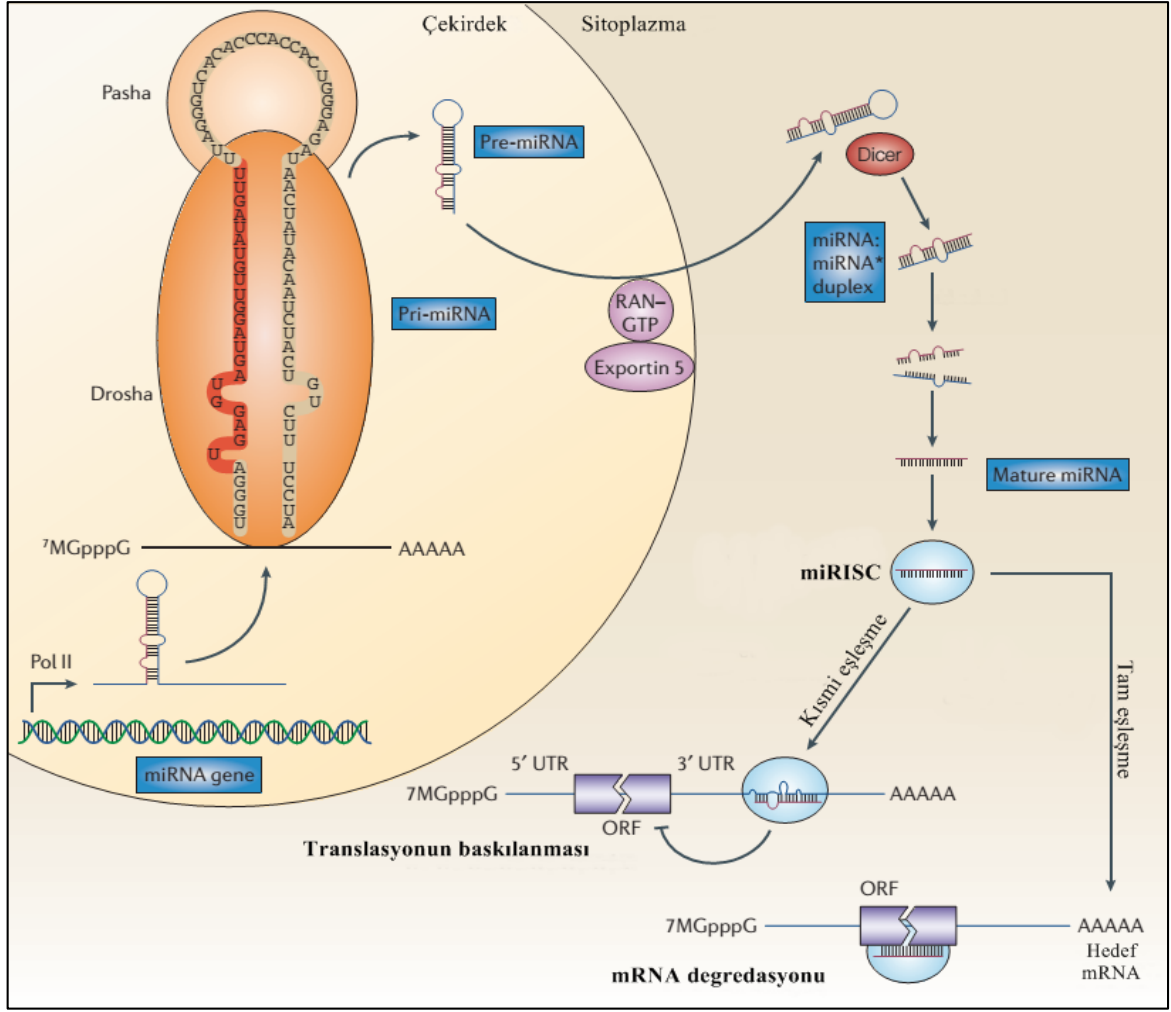
miRNA dupleksinin her iki zinciri de eşit etkiye sahip değildir ve hangi zincirin olgun miRNA olacağına dair karar kalıtsal etkenler ışığında termodinamik etkileşimler ile belirlenir (287). Genellikle miRNA'nın daha kararlı olan 5' ucuna sahip zinciri olgun miRNA olarak seçilirken, diğer zincir yıkılır (288). Yine de günümüzde ileri sekanslama yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar miRNA* olarak ifade edilen ve mRNA ile

birleşmeyen yapının her zaman yıkılmadığını ve etkin olabileceğini ortaya koymuştur (289).

2.6.3. MİKRORNA'LARIN ETKİ MEKANİZMASI

Olgun miRNA'lar gen ifadesini 2 yolla düzenlerler: mRNA'ya tam olarak komplementerlik görülen durumda mRNA'nın yıkılması veya bağlanma derecesinin düşük olduğu durumlarda translasyonun baskılanmasıdır (Şekil 2.6) (240).

miRNA'lar mRNA yıkılmasını ya da translasyonel baskılamayı birkaç yolla gerçekleştirmektedir; 1) miRISC'in mRNA'ya bağlanması sonucunda mRNA'nın poly (A) kuyruğu deadenilasyona uğrar ve deadenil mRNA'lar işlem cisimleri (p-body'ler) içine taşınarak depolanır veya yıkıma uğrar, 2) miRISC'in bağlanmasından sonra mRNA'nın şapka yapısının değişmesine neden olarak translasyonun başlamasını engelleyebilir, 3) mRNA'ya bağlanan miRISC'in etkisi ile oluşan protein sentezi sırasında oluşan polipeptid zinciri proteolize uğrayabilir veya 4) miRISC mRNA'ya bağlanarak ribozomların mRNA üzerinden düşmesine veya peptid sentezinin yavaşlamasına neden olmaktadır (290).



Şekil 2.6. miRNA biyogenez basamakları ve etki mekanizması (291).

2.6.4. MİKRORNA'LAR VE KANSER

miRNA ifadesinin düzenlenmesinin bozulması insan kanserinin tüm tiplerinde yaygındır. İlk çalışmalar tümörler ve normal dokular arasındaki farklı miRNA ifade profillerini göstermiştir (292,293). Üstelik miRNA'lar tümörlerin başlangıcı ve ilerlemesiyle ilişkili ana transkriptleri düzenlediği için miRNA ifadesindeki değişkenlikler hastalığın şiddetiyle ilişkilidir. miRNA'lar tümörigenezi artırmak ve baskılamak için onkogen veya tümör baskılayıcı olarak görev yapabilir (294). İfadesi tümörlerde artan miRNA'lar genellikle tümör baskılayıcı genlerinin, hücre döngüsü, hücre farklılaşması ve apoptozu kontrol eden genlerin ifadesini baskılayarak tümör gelişimini artırdıkları için onkogenler olarak görülmektedir (295). Aksine ifadesi kanser hücrelerinde azalan miRNA'lar tümör baskılayıcı olarak adlandırılmaktadır. Tümör baskılayıcı miRNA'lar genellikle onkogenleri,

hücre farklılaşmasını veya apoptozu kontrol eden genlerin ifadesini baskılayarak tümör gelişimini önlemektedir (294). miRNA ifadesinin düzenlenmesindeki bozukluklar sıklıkla delesyonlar, amplifikasyonlar, nokta mutasyonları ve anormal DNA metilasyonla gösterilen genetik veya epigenetik değişikliklerden meydana gelmektedir. İnsan miRNA'larının yaklaşık yarısı çeşitli kanserlerde kromozomların kırılma bölgelerinin içinde bulunmaktadır (296).

Kanserde miRNA profillerinin hastalığın tanı ve tedavisinde belirteç olarak değeri vardır. Örneğin kökeni bilinmeyen primer tümörlü hastalarda metastatik tümörün köken aldığı dokuyu tespit edebilmek imkansızdır. Çoğu miRNA hassas doku özgüllüğü gösterdiği için, bu lezyonların miRNA profillemesi yararlı olabilir. miRNA temelli sınıflandırmanın mRNA profillemesine göre kanserlerin köken aldığı dokuyu tanımlamada daha etkili olduğu görüldüğü için ilk bulgular umut vericidir. İnsan kanserlerinin miRNA profillemesi prognostik bilgi sağlayarak en iyi tedavi stratejisi seçimine rehberlik edebilir. Klinikte hastalarda yüksek verimlilik çalışmaları miRNA profillemesinin tümörleri sınıflandırma ve yüksek doğrulukla hasta sonucunu öngörme potansiyelini açığa çıkarmıştır (293). Özet olarak ortaya çıkan kanıtlar kanserle ilişkili miRNA'ların (onkomiR) insan kanserlerinde önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Bazı miRNA'lar hücre farklılaşması ve apoptozu kontrol ederek kanser gelişiminde direk olarak ilişkili olabilirken diğerleri kanser onkogenleri ve/veya tümör baskılayıcıları hedefleyerek kanserde ilişkili olabilir.

2.6.5. HEMATOPOEZİN DÜZENLENMESİNDE MİKRORNA'LAR

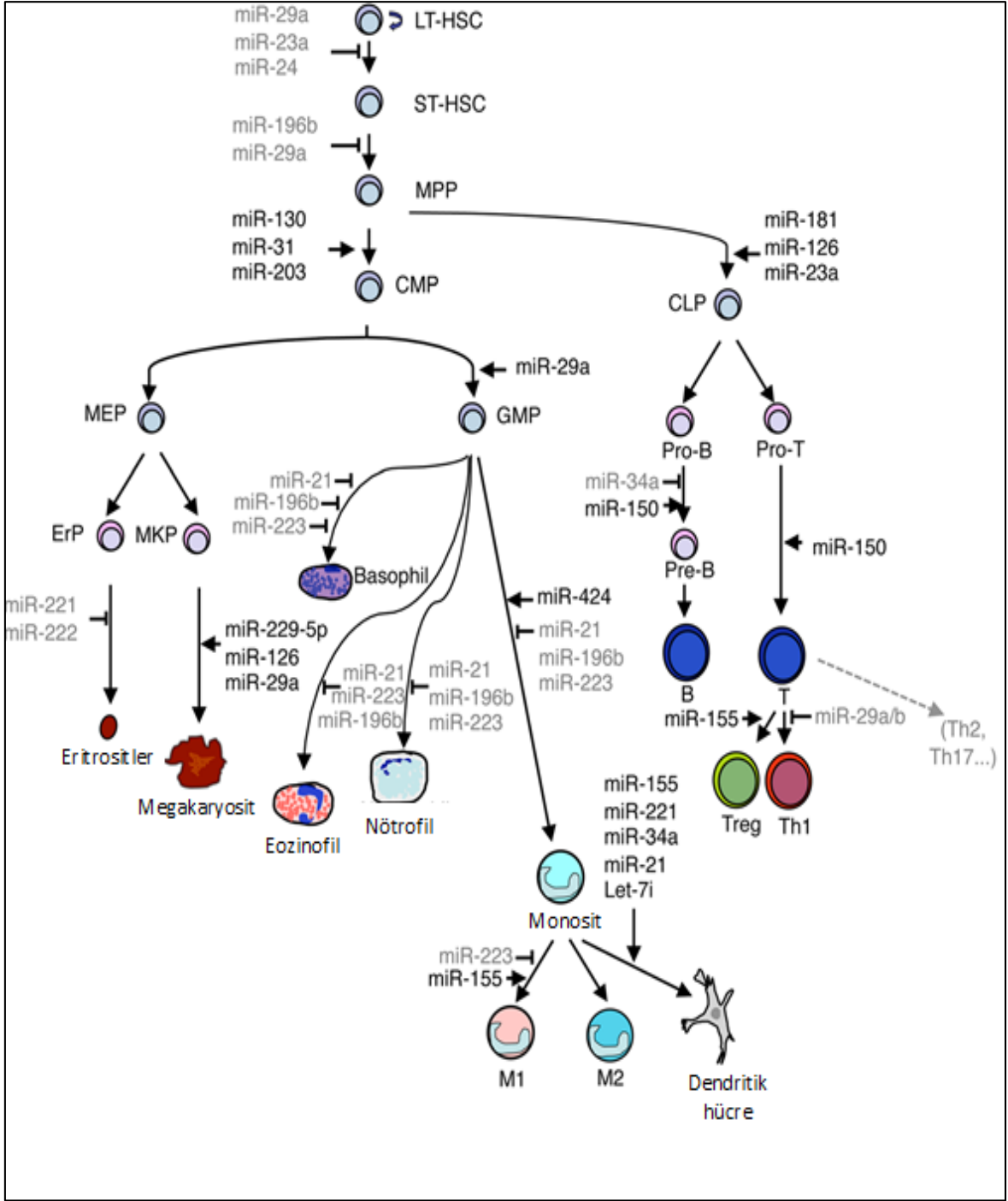
miRNA'ların hematopoezdeki veya aslında hematolojik malignitelerdeki rolü az çalışılmıştır. Chen ve arkadaşları fare kemik iliğinden yaklaşık olarak 150 miRNA'yı klonlamıştır ve miR-181a, miR-223 ve miR-142'nin hematolojik dokularda ifade edildiğini tespit etmiştir (297). miR-181A B-dizin hücrelerinin oranında artışa yol açmaktadır. miR-223 ve miR-142 miyeloid serilerde oldukça fazla ifade edilmektedir.

Eritropoezde miRNA'ların rolü miR-221 ve miR-222'yi insan kordon kanı kökenli hematopoetik CD34⁺ progenitör hücrelerinde aşırı ifade edilmiş olarak tanımlayan Felli tarafından ele alınmıştır (298). Bu miRNA'ların düzeylerinin tek dizinli eritroid farklılaşmasına karşılık olarak azaldığı bulunmuştur. Biyoinformatik analizler her iki

miRNA'nın KIT'i hedeflediğini göstermiştir ve bu mRNA'nın düzeylerinin miR-221 ve miR-222 düzeyleriyle ters olarak bağlantılı olduğu bulunmuştur (298).

Miyeloid farklılaşmadaki miR-223'ün fonksiyonu granülositik farklılaşmanın iki transkripsiyon faktörüyle birlikte (NFIA ve CEBPA) miR-223 tarafından düzenlendiğini kanıtlayan Fazi ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (299). CD34⁺ kemik iliği hücrelerinden köken alan *in vitro* ortamda farklılaştırılmış megakaryositlerin ifade analizleri megakaryositopoezin bir özelliği olarak miR-10a, miR-10b, miR-126, miR-17 ve miR-20'nin ifadesinde azalmayı tanımlamıştır (300).

Son zamanlarda CD34⁺ hematopoetik kök-progenitör hücreleri (HKPH) ile yapılan bir çalışmada ifadeleri hem kemik iliğinden hem de perifer kandan köken alan HKPH'lerde ortak olan miR-155, miR-181a, miR-221, miR-222, miR-223, miR-146 ve miR-16-1 gibi 33 miRNA tanımlanmıştır. Araştırmacılar miR-16-1, miR-103 ve miR-107'nin HKPH gelişiminde daha sonraki aşamada farklılaşmayı engelleyebilirken miR-17, miR-24, miR-146, miR-155, miR-128 ve miR-181'in erken aşama progenitör hücrelerin daha olgun aşamaya farklılaşmayı engelleme görevi olabileceğini öngörmüşlerdir. miR-221, miR-222 ve miR-223'ün hematopoetik gelişimin son aşamalarını kontrol ettiği ileri sürülmüştür. (Şekil 2.7) (301).



Şekil 2.7. Hematopoetik gelişimde miRNA'ların rolü. Belirli bir aşamayı engelleyen miRNA'lar gri renk ile belirtilirken gelişimi artıran miRNA'lar siyah renk ile işaretlenmiştir. LT-HSC: uzun-dönem hematopoietik kök hücre; ST-HSC: kısa-dönem hematopoietik kök hücre; MPP: multipotent progenitörler; CMP: ortak miyeloid progenitör; CLP: ortak lenfoid progenitör; MEP: megakaryosit-eritroid progenitör; GMP: granülosit-makrofaj progenitör; ErP: eritroid progenitör; MKP: megakaryosit progenitör (302).

2.6.6. MKH'LER VE MİKRORNA'LAR

HKH'lerle karşılaştırıldığında miRNA ve MKH'ler arasındaki bağlantı daha yakın zamanda bulunmuştur (303). MKH'lerin ilginç terapötik potansiyelinden dolayı MKH kendini yenilemesi ve farklılaşmasındaki miRNA'ların rolü hakkındaki çalışma sayısı hızla artmaktadır. Birkaç miRNA'nın farklı gelişimsel aşamalarda ve serilerdeki MKH'lerin düzenlenmesinde ilişkili olduğu belirtilmiştir. Genellikle miRNA ifadeleri MKH progenitörlerinde ve osteoblastlar, adipositler ile kondrositler gibi tamamen farklılaşan hücrelerde farklıdır. Aslında bazı miRNA'ların yüksek veya düşük ifadesi MKH'lerin belirli serilere yönelmesi ve farklılaşması için öngereklilik olabilir (304).

miRNA'ların çoklu MKH serilerinde rol oynayabileceği belirtilmiştir. İnsan MKH'lerinde miR-138'in azalan ifadesi osteojenik (305) ve adipojenik farklılaşmayla (306) ilişkilidir. Fakat hedef moleküller ve miRNA'ların biyolojik fonksiyonları hücrel çevreye bağlıdır. Osteojenik uyarı altında miR-138'in ifadesi *in vitro* ortamda osteoblast farklılaşmayı engellemiştir ve normal osteoblast farklılaşması için gerekli olan fokal adezyon kinazın baskılanmasıyla *in vivo* ortamda kemik oluşumunu zayıflatmıştır (305). miR-138'in osteogenez ve adipogenez üzerinde paralel etkisi olduğu görünürken miR-204/211 ve miR-637'nin insan MKH'lerindeki adiposit ve osteoblast farklılaşma arasındaki dengeyi kontrol ettiği belirtilmiştir (307,308). miR-204/211'nin ifadesi osteoblast farklılaşmasını engellerken osteogenezde engelleyen ve adipogenezde uyaran bir transkripsiyon faktörü olan Runx2'nin baskılanmasıyla adiposit oluşumunu artırmıştır (307). Aksine miR-637'nin aşırı ifadelenmesi adipojenik farklılaşmayı artırmış ve osteogenezde önemli bir transkripsiyon faktörü olan Osterix'i hedefleyerek osteojenik farklılaşmayı baskılamıştır (308).

Bu çalışmaların aksine miRNA'ların kondrojenik farklılaşmadaki rolü ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. İnsan CD146⁺ MKH'lerinin kondrojenik farklılaşması boyunca miRNA ifadesinin karakterizasyonu 36 miRNA'nın ifadesinde artış ve azalmayı kanıtlamıştır, fakat miRNA'ların kondrogenezdeki rollerini doğrulamak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır (309).

HKH'lerdeki gibi MKH kendini yenilemesinde miRNA'ların ilişkisi hakkında daha azı bilinmektedir. Yapılan ilginç bir çalışmada insan MKH'lerinin göçü ve farklılaşması

yanısına çoğalmasını kontrol etmede RUNX2 sinyal yolağının aktivasyonunun engellenmesinde miR-335'in önemli rolü olduğu gösterilmiştir (310). Çeşitli dokulardan izole edilen farklılaşmamış MKH'lerde miR-335'in ifadesinde artış görülürken MKH'lerin farklılaşması miR-335'in ifadesinde azalmaya yolaçmıştır. Üstelik miR-335'in aşırı ifadesi insan MKH'lerinin çoğalması, göç ve farklılaşmasını azaltmıştır ve MKH fonksiyonunun ana düzenleyicileri olan WNT3A ve IFN- γ 'nın miR-335 ifadesini ayarladığı gösterilmiştir. Benzer mekanizmalar farklılaşmamış MKH'lerdeki yüksek ifadesi osteoblastlara (305) veya adipositlere (306) farklılaşma boyunca gittikçe azalan miR-138 için gösterilmiştir. Sonuç olarak bu ve önceki çalışmalar MKH farklılaşması ve fonksiyonunun düzenlenmesinde miRNA'ların önemli rolünü kanıtlarken MKH kendini yenilemesindeki miRNA'ların etkileri daha fazla kanıt gerektirmektedir.

2.6.7. KÖK HÜCRE NİŞİ VE MİKRORNA'LAR

Kemik iliğinde bulunan HKH ve MKH'ler rejeneratif tıpta kullanılmak için büyük potansiyel sunmaktadır. Kök hücre farklılaşmasında miRNA'ların rolü üzerine çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen kök hücre nişindeki miRNA'ların rolü belirsizdir. Fakat HKH nişinde miRNA'ların rolünü destekleyen birkaç özellik bulunmaktadır. İlk olarak; MKH'ler, osteoblastlar ve endotelyal hücreler gibi diğer potansiyel niş hücrelerinin olgunlaşması yanısıra HKH kendini yenilemesi ve farklılaşmasındaki düzenleyici rolleri nedeniyle miRNA'ların HKH niş fonksiyonunu etkilemesi olasıdır. İkincisi; kök hücre farklılaşmasıyla ilişkili olan miRNA ile düzenlenen sinyal yollarının çoğu aynı zamanda HKH nişlerinde önemli rol oynamaktadır. Üçüncüsü; miRNA'ların mikroveziküllerle salınabileceği ve başka hücrelere taşınabileceği gözlemleri hücreler arası iletişimde miRNA'ların potansiyel rolünü göstermektedir (311).

Son yıllarda yapılan bazı kapsamlı araştırmalar miRNA'ların kemik iliği kök hücreleri üzerindeki rolünü göstermiştir. HKH ve MKH'lerin çeşitli serilerinde miRNA ifadesinin kapsamlı tanımı miRNA'ların zaman ve aşamaya göre kök hücrelerin farklılaşmalarını düzenlediğini işaret etmiştir. Bazı deneysel kanıtlar kök hücre nişinin düzenlenmesinde miRNA'ların ilişkisini desteklemektedir. Örneğin farklı miRNA ifade profilleri son zamanlarda hücrelerin nişlerine yönlendirilmiş göçüyle ilişkili bir kemokin olan CXCL12'nin düşük veya yüksek düzeylerini ifade eden insan stromal hücre hatları için

tanımlanmıştır (312). miRNA ifadesinin tanımlanması sonucu CXCL12'yi düşük düzeyde ifade eden hücrelerde miR-886-3p'nin ifadesinde 48 kat artışın olduğu tespit edilmiştir. Zerneck ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada endotelial hücrelerden köken alan apoptotik cisimciklerde miR-126'nın yüksek ifadesi rapor edilmiştir. Özellikle apoptotik cisimciklerden salınan miR-126'nın alıcı endotelial hücrelerde CXCL12 ifadesini artırdığı gösterilmiştir (313). Yapılan bir başka çalışmada miR-126'nın CXCL12 ifadesini baskılayarak endotelial progenitor hücre hareketini düzenlediği kanıtlanmıştır (314). Diğer bir çalışmada osteoblast farklılaşmasıyla ilişkili olan ana transkripsiyon faktörü Runx2'nin bir miRNA grubuyla kontrol edildiği gösterilmiştir (315). Bu miRNA'ların ifade düzeyleri osteoblast farklılaşması boyunca artmış ve kondrosit farklılaşması boyunca azalmıştır. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde miRNA'ların kök hücre nişinde mikroçevresel olarak düzenleyici rollerinin olması olasıdır.

2.6.8. MDS VE AML'DE MİKRORNA'LAR

2.6.8.1. MDS'de MikroRNA'lar

İnsan AML'de miRNA'ların rolünü anlamada önemli gelişmelere ulaşılmasına rağmen ne yazık ki MDS'de miRNA'ların rolü hakkında daha azı bilinmektedir. miRNA'ların fonksiyonunda anormal ifade ve değişiklikler şüphesiz bir şekilde açıktır ve böylece miRNA'lar MDS'nin patofizyolojisine katkıda bulunabilir. İnsan kanserinde miRNA düzenlenmesinin bozulması mekanizmaları hakkında bilgi vardır. MDS'de düzenlenmesi bozulan miRNA'ların mekanizmalarını tanımlayan daha az çalışma olmasına rağmen temelde yatan mekanizmalar muhtemelen diğer insan kanser tiplerinde rapor edildiği gibi benzer olmalıdır. Dengesiz sitogenetik değişiklikler MDS hastalarında en yaygın yapısal anormalliklerdir. MDS hastalarının %50'den fazlası büyük kopya sayısı kazanımları ve kayıplarını sergiler. Sitogenetik değişiklikler muhtemelen değişen miRNA ifadesinin başlıca katkı sağlayıcısıdır. MDS ve AML örneklerinin son bir detaylı genomik analizi yapılmış ve miRNA'ların çoğunluğunun (%70) kopya sayısı değişikliklerine haritalandığı bulunmuştur (316). Normal CD34⁺ hücreleriyle karşılaştırıldığında bu miRNA'ların çoğunluğu AML ve MDS örneklerinde ifadesinde önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Bu çalışma çoğu miRNA'nın kırılmalı ve genomik değişiklikler gösteren bölgelerde yerleşmiş

olduğunu ve bu miRNA'ların sadece bir alt kümesinin ifadesinin önemli derecede değiştiğini ve muhtemelen miyeloid malignitelerle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Yapılan son çalışmalarda mikrodizin temelli platformlar kullanılarak MDS hastalarında miRNA'ların değişik ifadeleri tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada 24 MDS hastası ve 3 kontrol örneğinden elde edilen ayrılmamış kemik iliği hücrelerinden elde edilen miRNA'ların ifadesi düşük densite real time PCR temelli array ile analiz edilmiştir (317). Örnekler yaklaşık olarak %60 düşük risk ve %40 yüksek risk hastalardan oluşmaktaydı. İlginçtir ki, bu çalışmada miRNA imzası kromozomal değişikliği olan MDS'yi normal karyotipli MDS'den ayırmıştır.

Benzer bir yaklaşımla Sokol ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada 44 MDS hastasından ve 17 normal kontrolden izole edilen kemik iliği MNH'lerinde global miRNA ifadesini araştırmıştır (318). Hasta örneklerinin % 66'sı düşük-orta-1 ve %33'ü orta-2/yüksek-risk MDS hastalarından oluşmuştur. Mikrodizinle tespit edilen 290 miRNA arasından 76'sı tüm MDS hastası ve kontroller arasında farklı bir şekilde ifade edilmiştir. Bunlardan 13 miRNA'nın ifadesinde MDS ve kontroller arasında önemli derecede farklılık bulunmuştur. Farklı bir şekilde ifade edilen miRNA'lar aynı zamanda düşük ve yüksek risk MDS hastaları arasında da incelenmiştir. Araştırmacılar miR-181a/c/d, miR-221, miR-376, miR-125b, miR-155, miR-130a'nın ifadesindeki artmanın ve miR-486-5p'nin ifadesindeki azalmanın yüksek-risk MDS ile ilişkili olduğunu ve bu miRNA imzasıyla yüksek-risk MDS hastalarının düşük risk hastalardan tam olarak ayırt edildiğini rapor etmiştir.

Diğer bir çalışmada, 43 MDS hastasından ve 9 sağlıklı donörden CD34⁺ kemik iliği hücrelerinden miRNA'lar izole edilmiştir (319). Hastaların %40'ı düşük risk MDS ve %60'ı yüksek risk MDS'den oluşmuştur. Normal kontrollerle karşılaştırıldığında Illumina array platformu (human v2, Illumina Inc., San Diego, CA, USA) kullanılarak 22 miRNA'nın tüm MDS alttiplerinde farklı bir şekilde ifade olduğu bulunmuştur. Bunlardan 13 miRNA'nın ifadesi artmış, 9 miRNA'nın ise ifadesi azalmıştır. 22 farklı ifade edilen miRNA'nın hiyerarşik kümelenmesi normalleri MDS hastalarından ve aynı zamanda MDS alttiplerini birbirinden ayırmıştır.

Birkaç raporda MDS’de belirli miRNA’lar profillenmiştir. Pons ve arkadaşları 25 MDS hastası ve 12 kontrol örneğinin kemik iliğinde 25 olgun miRNA’nın ifadesini tespit etmiştir (320). Hasta çoğunluğu ağırlıklı olarak RCMD ve RCMD-RS olarak sınıflandırılan normal karyotipli (% 56) düşük-risk MDS hastalarını (% 88) içermektedir. PCR ile incelenen 25 miRNA’dan 12’si farklı bir şekilde ifade edilmiştir. Hasta ve kontroller arasında miR-17-92 kümesi, miR-10a/b, miR-15a/miR-16, miR-21, miR-126, miR-155, miR-181 ve miR-222 aşırı ifade edilirken düşük ve yüksek riskli hastalar arasında miR-15a ve miR-16 farklı ifade edilmiştir.

MDS için belirli miRNA biyobelirteçlerinin tanımlanması teşhis, prognoz ve hastalık yönetimini iyileştirebilir. Diğer insan hastalıkları gibi, biyobelirteç ve terapötikler olarak miRNA’ların potansiyeli henüz tamamen farkedilmemiştir. Protein kodlayan genlerin aksine miRNA’ların klinik ortamda ek avantajları vardır. Örneğin miRNA ifade profili farklı kanserleri sınıflandırmak için başarılı bir şekilde kullanılabilirken mRNA profilleri aynı örnek setine uygulandığında aynı şekilde başarılı bir ayırım sağlamayabilir (321). Ek olarak miRNA’lar daha sağlam, olası ve güvenilir analizlere olanak sağlayacak şekilde bozulmuş RNA preparasyonlarında daha karardır (322). Yukarıda belirtildiği gibi birkaç miRNA’nın ifadesi MDS alttıplerinde değişmiştir. Teşhis ve prognoz özellikle normal karyotipli MDS hastalarında zorlu olabilir, böylece biyobelirteç olarak miRNA’lar hastalık yönetiminde önemli araç olabilir. Bu çalışmalardan elde edilen bilgiler ileride ek çalışmalar gerçekleştirmek için bir itici güç olabilir. miRNA’ların diyagnostik ve prognostik araçlar olarak gerçek faydaları değerlendirilmelidir.

MDS’de miRNA ifadesini değerlendirmek için uygun RNA kaynağını seçmek zordur. MDS’de altta yatan moleküler anormallikleri anlamak için en uygun HKH popülasyonunu seçmek gereklidir, fakat diyagnostik ve prognostik ölçümler için gerekli değildir. İfadesi artan miRNA’lar muhtemelen takip etmek için en iyi aday biyobelirteç olacaktır. Diğer kanserler için kaynak olarak doğrulanan kan plazması, mikrovessiküller veya kemik iliği hücreleri MDS için miRNA biyobelirteçlerinin potansiyel kaynağı olarak görev yapabilir. Bu teoriye destek olarak MDS hastalarında dolaşımda olan let-7a ve miR-16’nın son zamanlarda tam sağkalımı öngördüğü gösterilmiştir (323).

MDS'nin diyagnozu ve prognozunun düşük risk olarak kategorize edilen hastalar için en zorlu olması gözönünde bulundurulduğunda düşük risk MDS hastalarında miRNA biyobelirteçleri çok yararlı olabilir. Ön bulgular miRNA'ların MDS'de diyagnostik amaçlar için kullanılabileceği umudunu göstermektedir (318,319). Bir çalışmada farklı bir şekilde ifade edilen 45 miRNA'nın hiyerarşik kümelemesi düşük riski yüksek riskten ayırmıştır. İki miRNA'nın ifadesi (miR-422a ve miR-617) hastalık ilerlemesiyle ilişkilidir. İkinci bir çalışmada 13 miRNA imzası MDS hastalarını kontrollerden ayırmıştır (318). Ek olarak 10 farklı miRNA düşük risk/orta-1 ve orta-2/yüksek risk MDS hastaları arasında tespit edilmiştir. Yüksek risk MDS hastalarında miR-181'in artan ifadesi hastalık ilerlemesini işaret edebilir, çünkü miR-181'in artan ifadesi aynı zamanda AML'de de rapor edilmiştir (324). Normal karyotipli düşük risk MDS hastalarının yaş uyumlu normal kontrollerden ayrılıp ayrılmayacağını belirlemek için ek çalışmalara gerek vardır.

2.6.8.2. AML'de MikroRNA'lar

AML'de de son yıllarda miRNA ifade profillemeye çalışmaları yapılmış ve hastalık biyolojisiyle, sitogenetik ve moleküler değişikliklerle, diyagnoz ve prognoz ile ilişkili miRNA imza profilleri tanımlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda miRNA'ların sağlıklı donörlerden (325) elde edilen CD34⁺ hücreleri veya kemik iliği örnekleriyle (326) karşılaştırıldığında AML blastlarında farklı şekilde ifade edildiği rapor edilmiştir (327,328). Garzon ve arkadaşları kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında yeni tanı almış AML örneklerinde ifadesi azalan 26 miRNA'yı tanımlamıştır ve ifadesi artan miRNA'yı tanımlayamamışlardır (327).

AML'de miRNA ifade profillemeye çalışmaları sitogenetik ve moleküler değişikliklerin miRNA imzalarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (325). Örneğin t(15;17)'li APL hastalarını diğer AML alttiplerinden ayıran eşsiz bir miRNA profili vardır (326,328). Diğer çalışmalar miRNA ifade imzalarıyla tekrarlayan moleküler değişiklikleri ilişkilendirmiştir. Örneğin Garzon ve arkadaşları miR-10a,b ve miR-196a'nın ifadesindeki artışla NPM1 mutasyonlu hastaları diğerlerinden net olarak ayıran güçlü bir imza bulmuşlardır (327). Bu miRNA'ların sadece lökomogenezle ilişkili olup olmadığı halen araştırılmaktadır.

Gen ifade profilinin AML ve ALL'yi ayırdığı kanıtlanan öncü bir çalışmaya (329) benzer şekilde miRNA ifadesindeki değişikliklerin de aynı zamanda dizin-spesifik lösemi tanımladığı gösterilmiştir. Boncuk-temelli miRNA ifade profillemeye deneyiyle Mi ve arkadaşları (330) ifadesi artan let-7b ve miR-223 ile ifadesi azalan miR-128a ve miR-128b'nin en ayırmedici olduğu 27 farklı şekilde ifade edilen miRNA temeline dayanarak AML'li hastaları ALL'li hastalardan ayırmıştır.

miRNA ifade profillemesiyle yapılan son çalışmalar AML'nin alttiplerinin birkaçının miRNA imzalarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. t(8;21)'li CBF-AML, inv(16) veya t(16;16)'lı CBF-AML ve t(15;17)'li APL gibi sitogenetik-risk alttiplerinin herbirini bir diğerinden ve diğer AML alttiplerinden ayırt eden özgün miRNA ifade profilleri vardır (326,328).

miRNA profillemesinin farklı sitogenetik gruplar arasında farklılaştığı görülmesine rağmen spesifik imzalar çalışmalar arasında farklıdır. Bu muhtemelen farklı gruplar tarafından kullanılan analitik metodların standardizasyon eksikliğinin sonucudur ve şu anda diyagnostik kriter olarak miRNA ifade profillerini kullanmayı engellemektedir. Bununla birlikte AML'de miRNA profillemesi diyagnostik araç olabilir, çünkü miRNA'ların dayanıklılığı daha uzun gen ifade profili analizlerinde kullanılan, kodlayan mRNA'lardan daha iyidir ve miRNA ifade profilinin diyagnostik profili aynı zamanda daha iyi olabilir. Örneğin 4 miRNA setinin herhangi ikisini kullanarak %97-98 tam diyagnostik doğrulukla ALL'leri AML vakalarından ayırmak mümkün olmuştur (330). Bu, ALL ve AML hastalarını doğru bir şekilde sınıflandırmak için çok sayıda probun gerektiği gen ifade profili çalışmalarından elde edilen sonuçlardan farklıdır (329).

NPM1 gen mutasyonlarının tamamının HOX genlerinin genomik kümesinde bulunan belirgin miRNA ifade imzasına bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (327). Bir başka çalışmada NPM1 mutasyonlu AML'de miR-204 ve miR-128a'nın ifadesinde azalma rapor edilmiştir ve hücre hattı deneylerinde miR-204'ün HOX gen kümesi üyeleri olan MEIS1 ve HOXA10 ifadesini baskıladığı gösterilmiştir (327). Son zamanlarda Becker ve arkadaşları 60 yaşında veya daha yaşlı olan *de novo* AML'li hastalarda NPM1 mutasyonlarıyla ilişkili 68 miRNA'dan oluşan bir miRNA ifade imzası rapor etmiştir. 34

miRNA'nın ifadesi artmış ve 34 miRNA'nın ifadesi NPM1 mutasyonlu hastalarda azalmıştır (331).

Çok az çalışma AML hastalarında miRNA ifade değişiklikleriyle klinik sonucu ilişkilendirmiştir. Son çalışmalar miRNA ifadesindeki değişikliklerin AML hastalarının klinik sonucunu etkileyebildiğini göstermiştir. Garzon ve ark. ağırlıklı olarak orta ve yüksek risk-sitogenetiği olan 122 yeni tanı AML hastasının sitogenetik olarak heterojen grubunda miRNA mikrodizin kullanarak miR-20a, miR-25, miR-191, miR-199a'nın ifadesindeki artışın genel sağkalımı olumsuz şekilde etkilediğini tespit etmiştir (327). Kanser ve lösemi grubu B (CALGB) çalışması normal karyotipli ve yüksek-risk moleküler özelliği olan genç hastalarda prognostik önemi olan bir miRNA ifade imzası tanımlamıştır (324). miR-181a ve b'nin artan ifadesi iyi prognoz ile ilişkiliyken miR-124, miR-128-1, miR-194, miR-219-5p, miR-220a, miR-320'nin daha yüksek ifadesinin kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (324).

Bu çalışmalarda MDS/AML'de miRNA'ların ifadesinin değiştiği gösterilmiştir, fakat bu miRNA'ların çoğunluğunun fonksiyonları halen bilinmemektedir. Lökomogenez boyunca miRNA'lar tarafından hedeflenen genleri ve yolları tanımlamak kritik bir aşamadır. Bunun zor bir iş olduğu görünmektedir, çünkü miRNA'ların insan genomunun %30'undan daha fazlasını kontrol ettiği öngörülmektedir ve tek bir miRNA yüzlerce geni hedefleyebilir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Yıllardır kemik iliği mikroçevresinin hematopoezi düzenlemede aktif rol oynadığı öngörülmüştür ve bazı yeni çalışmalar bu rolü doğrulamaktadır. Son yıllarda MKH'lerin belirli hematolojik hastalıkların kökenleri ve ilerlemedeki muhtemel ilişkisi önemli tartışma konularından biri haline gelmiştir. MKH'lerin bazı hematolojik hastalıklarda düzeylerinin ve/veya fonksiyonlarının değişip değişmediği ve böyle değişikliklerin hastalığın ilerlemede katkısının olup olmadığı hakkında çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Aksini gösteren araştırmalar olmasına rağmen MDS/AML kemik iliği MKH'lerinde fonksiyonel, morfolojik, kantitatif ve moleküler anormallikler çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir. Fakat kemik iliği MKH'lerindeki bu anormalliklerin insan MDS/AML patogeneziyle ilişkisi olup olmadığı ve nasıl bir ilişkisi olduğu tam olarak bilinmemektedir.

Yakın zamanda fare modellerinde yapılan çalışmalarda kemik iliği mikroçevresinin MDS ve AML gibi hematolojik hastalıkların başlangıcı ve ilerlemede aktif rol oynadığına dair önemli kanıtlar elde edilmiştir. Bu araştırmalardan elde edilen bulgularda MDS ve AML patogenezi mikroçevrenin önemli rol oynadığı belirtilmektedir. Yapılan son bir araştırmada MDS ve AML patogenezi mikroçevrenin katkısı tam olarak kanıtlanmıştır. Bu çalışmada Raaijmakers ve arkadaşları (19) mezenkimal osteodizin hücrelerinin hematopoezi nasıl düzenlediğini incelemek amacıyla fare osteoprogenitörlerinde DICER-1 gen delesyonu oluşturmuştur. DICER-1 gen delesyonu "global miRNA ifade azalması"na yol açarak osteojenik farklılaşmayı azaltmış, kan oluşumunun bozulmasına sebep olarak yetersiz hematopoeze, MDS, AML ve Miyeloid Sarkoma'ya yol açmıştır. Üstelik MDS ve AML'li hematopoetik hücreler normal mikroçevreli fareye transplante edildiğinde bu hücreler normale dönüşmüştür. Çalışma sonuçları miRNA biyogenezi için gerekli bir RNaz enzimi olan DICER-1 gen delesyonunun miRNA'ların global ifade azalmasına yol açarak tümörigenezi tetiklediğini, böylece anormal mikroçevrenin hematopoetik hastalıkların başlangıcı ve ilerlemede aktif rol oynadıklarını göstermektedir. Bulgular mikroçevresel değişikliklerin MDS'nin klonal ilerlemede rol oynadığını göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada osteoprogenitör hücrelerdeki delesyon hematolojik malignitelere yol açmıştır. Osteoprogenitör hücreler HKH nişinin önemli bir kısmını oluşturur ve HKH

fonksiyonunu düzenleyerek hematopoeze katkıda bulunur. Bu hücreler MKH'lerden köken almaktadır. MKH'ler hematopoetik mikroçevrenin ana bileşeni ve düzenleyicileridir. Hematopoetik mikroçevrenin parçasını oluşturan başlıca hematopoetik olmayan hücre tipleri MKH'lerdir. Kemik iliği mikroçevresinin hematopezi esas destekleyen hücreleri olan “adipositler, osteoblastlar, kondrositler ve fibroblastlar” aslında MKH'lerden meydana geldiği ve MKH'lerin çeşitli şekillerde hematopoezde önemli rol oynadıkları için MDS/AML gibi hematopoez bozukluk görülen hastalıklarda başlıca MKH anormalliklerinin bulunabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. MKH'ler MDS/AML gibi hastalıklardaki stromal değişiklikleri göstermek için en uygun hücrelerdir. Çünkü MKH'ler hücre-hücre teması yanı sıra sitokin, büyüme faktörleri ve ekstraselüler matriks moleküllerini üretmesiyle hematopoetik niş ve hematopoezin düzenlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Ayrıca MKH'lerin ürettiği ekstrasellüler matriksteki kollajenler, laminin ve fibronektin birçok adezyon molekülüne bağlanarak hematopoezde rol oynarlar. Bütün bunlar hematopoezin düzenlenmesinin “MKH'ler” tarafından yapıldığını göstermektedir. Bu nedenle MDS/AML hastalıklarında kemik iliği kökenli “farklılaştırılmamış MKH'lerdeki miRNA değişikliklerinin gösterilmesi” amaçlanmıştır.

Raaijmakers'ın yapmış olduğu araştırmada DICER-1 gen delesyonu MDS/AML gibi hematolojik hastalıkların oluşumuna yol açtığı için MDS ve AML'de DICER-1 gen ifadesinde bozulma olması muhtemeldir. Bu nedenle çalışmamızda DICER-1 geninin ifade analizinin yapılması planlanmıştır. Araştırma sonuçları miRNA'lardaki ifade bozukluklarının hastalık patogeneziindeki ilişkisini göstermekle birlikte miRNA'ların normal hematopoez ve hematopoetik nişte mikroçevresel faktör olarak düzenleyici rollerinin olduğu varsayımını güçlendirmektedir. Fakat hangi miRNA'nın bu hastalıklarla ilişkisinin olduğu ve normalde hangi miRNA'nın hematopoezin düzenlenmesinde mikroçevresel olarak rol aldığı belli değildir. MDS ve AML kemik iliği kökenli MKH'lerinde hematopoetik niş üzerinde düzenleyici rolü olabilecek miRNA'ların düzeylerinde anormallikler ve bu anormalliklerin hastalık patogeneziyle ilişkisinin olması muhtemeldir. miRNA'lar çeşitli gelişimsel, fizyolojik olaylarda, kök hücrelerin yenilenmesinde, farklılaşmasında, apoptozda ve hematopoezde önemli rol oynamaktadırlar. Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler miRNA'ların MKH ve HKH gibi kök hücrelerin farklılaşmasında ve hematopoezde önemli rol oynadıklarını

göstermektedir. Kök hücre farklılaşmasında miRNA'ların rolü üzerine çok fazla araştırma yapılmasına rağmen "miRNA'ların kök hücre nişindeki düzenleyici fonksiyonları" belirsiz kalmıştır. Fakat miRNA'ların HKH nişinde düzenleyici rolünün olabileceğini destekleyen bazı kanıtlar vardır. miRNA'ların MKH'ler, osteoblastlar ve endotel hücreler gibi diğer potansiyel niş hücrelerinin olgunlaşması yanısıra HKH kendini yenilemesi, farklılaşmasının düzenlenmesindeki rolleri tanımlandığı için HKH niş fonksiyonunu düzenlemeleri olasıdır. Üstelik son yıllarda yapılan birkaç çalışmada hematopoetik mikroçevreyi oluşturan hematopoetik olmayan hücrelerdeki sitokin ve adezyon molekül ifadelerinin düzenlenmesinde rol alan miRNA'ların bulunması hematopoetik niş üzerinde miRNA'ların önemli düzenleyici rolünün olabileceğini göstermektedir. miRNA ve diğer hücre yolakları arasındaki etkileşimleri tamamen anlamak için bu düzenleyici olayların kapsamlı karakterizasyonunun yapılması gereklidir. MDS/AML'de "hematopoetik hücrelerde" miRNA çalışmaları yapılmasına rağmen MDS ve AML MKH'lerindeki miRNA'ların ve hedef genlerinin ifadelerinin değişip değişmediği, bunların hastalık patogenezindeki rolleri günümüze kadar kapsamlı olarak gösterilmemiştir. Bu nedenle MDS/AML MKH'lerindeki miRNA'larda ve bu miRNA'ların hedef genlerinde ifade değişikliği olup olmadığı, varsa bu değişikliklerin hastalık patogenezindeki katkısı belli değildir. Bu nedenlerden dolayı tez çalışmasında miRNA biyogenezinde rol alan DICER-1 gen ifadesi yanısıra miRNA ifade analizlerinin yapılması planlanmıştır.

Bu tez çalışmasında ifadesinde önemli değişiklikler tespit edilen mikroRNA'ların tanımlanması, bu miRNA'ların hedefledikleri genlerin belirlenmesi, DICER-1 geninin ifadesindeki değişikliğin araştırılması, böylelikle MDS/AML MKH'lerinde miRNA/gen boyutundaki moleküler değişikliklerin bu hastalıkların patogenezindeki mikroçevresel rolünün anlaşılması amaçlanmıştır.

Çalışmamız, global miRNA ifade analizleriyle ifadesinde önemli değişiklikler olan miRNA'ların tespit edilerek hastalarda MDS/AML erken tanısına yönelik kit (biyobelirteç) oluşturulmasında önemli potansiyel taşıması ve niş üzerinde miRNA terapi uygulamaları için yapılacak çalışmalara önemli katkılar sağlaması bakımından önemlilik arz etmektedir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. HASTA VE SAĞLIKLI KONTROL ÖRNEKLER

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Hematoloji Bilim Dalı polikliniklerinden temin edilen yeni tanı konulmuş MDS ve AML hastalarından tanı amaçlı alınan kemik iliği örneklerinin bir kısmı (2-5 ml) bu çalışma için kullanılmıştır. Sağlıklı kemik iliği nakli vericilerinden toplanmakta olan kemik iliği aspirasyon örnekleri (2-5 ml) bu çalışmada kontrol örneklerini oluşturmuştur.

Çalışmada hastalardan kemoterapi başlanmadan ilk tanı anında alınan kemik iliği aspirasyon örnekleri kullanılmıştır. Araştırma grubuna alınan hasta sayısı 22 (yeni tanı 10 MDS ve 12 AML), sağlıklı kontrol sayısı da 8'dir (Çizelge 4.1). Çalışılan örneklerin elde edildiği bireylerin çalışmaya dahil edilmelerine dair onam formları kendilerinden ve/veya yakınlarından alınmıştır.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen örneklere ait bilgiler.

ÖRNEK NO	ALTTİP	YAŞ	CİNSİYET
AML-4	M1	63	E
AML-7	M3	37	K
AML-9	M4	50	K
AML-10	M4	72	K
AML-11	M1	70	K
AML-12	M4	21	E
AML-13	M1	21	E
AML-14	M3	52	E
AML-16	M2	58	E
AML-17	M4	45	K
AML-18	M4,M5	50	E
AML-19	Sınıflandırılmayan	50	E
MDS-1	RAEB-1	26	E
MDS-2	RA	25	E
MDS-3	RA	72	E
MDS-4	RA	61	K
MDS-5	RA	63	K
MDS-6	RA	21	E
MDS-7	RA	24	E
MDS-8	RA	58	K
MDS-9	RAEB-2	68	E
MDS-10	RCMD	70	E
SAĞLIKLI K-1	****	42	K
SAĞLIKLI K-2	****	56	K
SAĞLIKLI K-3	****	42	E
SAĞLIKLI K-4	****	26	E
SAĞLIKLI K-5	****	25	K
SAĞLIKLI K-6	****	36	E
SAĞLIKLI K-8	****	38	K
SAĞLIKLI K-9	****	35	K

RA: Refrakter Anemi; RAEB; Blast Artışlı Refrakter Anemi; RCMD; Çoklu dizide displazili refrakter sitopeni.

4.1.2. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN MATERYALLER

Hücre kültürü için DMEM-LG (Lonza, Katalog No: BE12-707F), Pen-Strep (Lonza, Katalog No: DE17-602E), Fetal bovine serum (Biowest, Katalog No: S181G-500) ve L-Glutamin (Lonza, Katalog No: 17-605E) kullanılmıştır.

4.1.3. RNA İZOLASYONUNDA KULLANILAN MATERYALLER

MKH'lerden RNA izolasyonu için Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Katalog No: 217004) kullanılmıştır.

4.1.4. MİKRODİZİN ÇİPLERİ VE KULLANILAN MATERYALLER

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen mikrodizin çalışması için Agilent Human miRNA Microarray, 19.0,8x60K platformu kullanılmıştır. Mikroarray deneyleri için miRNA complete labeling ve hibridizasyon kiti, miRNA spike-in kit, gen ifadesi yıkama solüsyonu kiti ve çift distile su kullanılmıştır.

4.1.5. cDNA SENTEZ REAKSİYONU KİTLERİ, EŞ ZAMANLI PZR KİTLERİ VE CİHAZLAR

mRNA ve miRNA eş zamanlı PZR analizleri LightCycler® 480 (Roche, 05015243001) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

miRNA'lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır. miRNA eş zamanlı PZR reaksiyonu için miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen,218073) kullanılmıştır.

mRNA'lardan cDNA sentezi için First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, 11483188001) ve eş zamanlı PZR reaksiyonu için LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, 04707516001) kullanılmıştır.

4.1.6. PRİMERLER

Çizelge 4.2. miRNA primerleri.

miRNA Adı	Qiagen Ürün Adı	Kat.No.	Sekans (5'>3')
hsa-miR-150-3p	Hs_miR-150-3p_1 miScript Primer Assay	MS0004995 2	CUGGUACAGGCCUGGGGACA G
hsa-miR-134-5p	Hs_miR-134_2 miScript Primer Assay	MS0003143 7	UGUGACUGGUUGACCAGAGGG G
hsa-miR-4646-3p	Hs_miR-4646-3p_1 miScript Primer Assay	MS0004053 0	AUUGUCCCUCUCCCUUCCCAG
hsa-miR-1275	Hs_miR-1275_2 miScript Primer Assay	MS0003778 6	GUGGGGGAGAGGCUGUC
hsa-miR-4725-5p	Hs_miR-4725-5p_1 miScript Primer Assay	MS0003971 1	AGACCCUGCAGCCUUCCCACC
hsa-miR-143-3p	Hs_miR-143_1 miScript Primer Assay	MS0000351 4	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-874-3p	Hs_miR-874_2 miScript Primer Assay	MS0002181 9	CUGCCCUGGCCGAGGGACCG A
hsa-miR-30d-5p	Hs_miR-30d_2 miScript Primer Assay	MS0000938 7	UGUAAACAUCCCCGACUGGAA G
hsa-miR-5581-5p	Hs_miR-5581-5p_1 miScript Primer Assay	MS0003831 8	AGCCUUCAGGAGAAAUGGAG A
hsa-miR-222-3p	Hs_miR-222_2 miScript Primer Assay	MS0000760 9	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
hsa-miR-30a-3p	Hs_miR-30a*_1 miScript Primer Assay	MS0000935 2	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAG C
hsa-miR-6165	Hs_miR-6165_1 miScript Primer Assay	MS0004548 6	CAGCAGGAGGUGAGGGGAG
hsa-miR-4462	Hs_miR-4462_1 miScript Primer Assay	MS0004498 9	UGACACGGAGGGUGGCUUGGG AA
hsa-miR-1914-3p	Hs_miR-1914*_1 miScript Primer Assay	MS0001654 8	GGAGGGGUCCCGCACUGGGAG G
hsa-miR-4652-3p	Hs_miR-4652-3p_1 miScript Primer Assay	MS0004047 4	GUUCUGUUAACCCAUCCCCUC A
hsa-miR-33b-3p	Hs_miR-33b*_2 miScript Primer Assay	MS0003743 6	CAGUGCCUCGGCAGUGCAGCC C
hsa-let-7b-3p	Hs_let-7b*_1 miScript Primer	MS0000828	CUAUACAACCUACUGCCUCC

	Assay		1	C
hsa-miR-324-3p	Hs_miR-324-3p_2 miScript Primer Assay		MS0000767 2	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG
hsa-miR-4436b-5p	Hs_miR-4436b-5p_1 miScript Primer Assay		MS0004131 4	GUCCACUUCUGCCUGCCCUGC C
hsa-miR-542-5p	Hs_miR-542-5p_1 miScript Primer Assay		MS0000714 7	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGA GA

Çizelge 4.3. mRNA primerleri.

Gen	F/R	Uzunluk (Baz)	Ürün Boyu	Sekans 5'>3'
DICER1	F	20	177	GGTCCACGAGTCACAATCAA
	R	20		AACAATGGAGGCTCGAAGAG
ACTB	F	20	125	CCAACCGCGAGAAGATGACC
	R	20		GGAGTCCATCACGATGCCAG
RUNX1	F	20	187	CCACTCCACTGCCTTTAACC
	R	20		TTCTGCAGAGAGGGTTGTCA
AKT3	F	22	172	TCTTCTCTGGAGTAAACTGGCA
	R	21		TCCATGCAGTCCATACCATCC
MYC	F	20	189	TACAACACCCGAGCAAGGAC
	R	20		AGCTAACGTTGAGGGGCATC
BDNF	F	20	186	GATCTTGGGGGCAAACACTG
	R	20		TAGGGCTTTCTTTACCGGG
IKBKB	F	20	116	TTCCCTGACAACGCAGACAT
	R	20		TGATGGCAATCTGCTCACCT
CASP3	F	20	236	AGCGAATCAATGGACTCTGG
	R	20		TCACGCATCAATCCACAAT
CALM3	F	20	166	AATGGATGTGGGGATGGTCG
	R	20		TTGCAGGTGCGTTCTCTTGA
BCR	F	20	228	ATGTCATCGTCCACTCAGCC
	R	20		CCTCCTTGGGGATCTTCGTC

4.2. YÖNTEM

4.2.1. KEMİK İLİĞİ ASPIRASYON ÖRNEKLERİNDEN MONONÜKLEER HÜCRELERİN (MNH) AYRIŞTIRILMASI

Hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan kemik iliği aspirasyon örnekleri birkaç saat içerisinde heparinli enjektörde steril koşullarda Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ulaştırılmıştır. Kemik iliği aspirasyon örneklerinden fikolle ayırıştırma yöntemine göre mononükleer hücre'ler (MNH) ayırıştırılmıştır. Kısaca kemik iliği aspirasyon örneği 1:1 oranında PBS ile karıştırılarak üzerine fikol yayılmış, kemik iliği içerisindeki MNH'ler 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrılmıştır. Santrifüj sonunda oluşan MNH tabakası toplanarak yeni bir tüpe aktarılmış, içerisinde MKH'leri de içeren tüm pelet homojenize edilerek 10 ml PBS ile sulandırılıp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Pellet üzerine 3-5 ml PBS eklenerek hücre sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.2.2. MKH İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ

Çalışmamızda toplanan taze kemik iliği aspirasyon örneklerinden fikolle ayırıştırma yöntemine göre izole edilen MNH'lerden daha sonra MKH izolasyonu ve kültürü işlemlerine geçilmiştir. İzole edilen MNH'ler hücre sayısına göre 5/10 ml büyüme besiyeri DMF10 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, %10 fetal bovine serum, %1 antibiyotik Penisilin-Streptomisin) ile birlikte T-25/T-75'lik flasklara aktarılıp 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde çoğalmaya bırakılmıştır. MNH'lerin kültüre edilmesini takiben her üç günde bir kültür kabının içerisindeki besiyeri değiştirilmiştir. Yapışmayan hücreler de böylelikle kültür ortamından uzaklaştırılmıştır. MNH kültürünün ilk 4-5. gününde yapışkan hücrelerin flask yüzeyine yapışması gözlemlenmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından hücreler flaskları %75-80 oranında kapladığında (MDS/AML MKH'lerinde bu oran çok daha düşük) tripsinizasyon işlemine geçilmiştir, tripsinizasyon işleminin ardından pasaj atlatılmıştır. Bu işlemler örnekler pasaj 3'e gelinceye kadar tekrarlanmıştır.

4.2.3. MKH'LERİN KARAKTERİZASYONU

4.2.3.1. Morfolojik Analiz

MKH'lerin karakterizasyonunda ilk adım olarak hücrelerin plastik yüzeye yapışabilmeleri ve iğsi-poligonal morfoloji göstermelerinin tespiti yapılmıştır. Bu özelliklerinin saptanması ters (inverted) mikroskop kullanılarak yapılmış olup hasta ve sağlıklı kontrol MKH'lerinin fotoğrafları çekilmiştir.

4.2.3.2. Yüzey Molekül Analizi (Akım Sitometri)

Akım sitometrisindeki yüzey molekül analizi çalışmaları MKH'lerin stromal kökenini ve adezyon moleküllerinin stromal belirteçlerinin ifade olduğu, buna karşılık hematopoetik belirteçlerin ifade olmadığı gösterilmesi için yapılmıştır. Tüm örneklerin yüzey molekül analizleri yapılmıştır.

4.2.3.2.1. Hücrelerin Hazırlanması

Hücrelerin yüzey moleküllerinin analizi için pasaj 3 MKH'ler kullanılmıştır. Kültür kabında üretilen hücreler PBS ile yıkanıp ardından 2 ml tripsin-EDTA eklenmiş, ardından 37°C'de 10 dakika bekletilip hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılması sağlanmıştır. İnkübasyon bitiminde tripsinin etkisini durdurmak amacıyla kültür kabına serum içeren büyüme besiyeri eklendikten sonra hücreler tüpte toplanmıştır. Tripan mavisi boyası kullanılarak sayımı yapılan hücreler FACS tüplerine, tüp başına 2×10^5 hücre olacak şekilde 2 ml PBS kullanılarak bölüştürülmüş, ardından 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılan tüplerdeki hücre peleti homojenize edilmiştir.

4.2.3.2.2. Hücrelerin İşaretlenmesi

Homojenize edilen hücre peleti üzerine 100 µl PBS ile birlikte her birinden 5 µl olacak şekilde CD73, CD90, CD44, CD29, CD34, CD45 antikorlarından eklenmiştir. Tüpler +4°C'de ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir; inkübasyon bitiminde 2 kez PBS ile yıkama yapılan tüplere 200 µl PBS eklenerek FACS Aria cihazı ile okutulmuştur.

4.2.3.2.3. İşaretlenmiş Hücrelerin Yüzey Molekül Analizi

Analiz toplam 10,000 olgu okutularak FACS Aria cihazı ile yapılmıştır. Analiz için BD FACS Diva Software v6.1.2 yazılımı kullanılmıştır.

4.2.3.3. Farklılaşma Analizi

Morfolojik analizleri ve yüzey molekül analizleri yapılan hücrelerin MKH olup olmadığının anlaşılmasında diğer bir adım olarak MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma analizleri yapılmıştır.

4.2.3.3.1. Adipojenik Farklılaştırma

İkinci pasajda olan hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek (pasaj 3'e geçilmiştir) çoğaltılmıştır. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından tüm kuyucuklar 1 ml PBS ile yıkanıp adipojenik farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri (DMEM-LG, %10 serum, 1 µM deksametazon, 60 µM indometazin, 500 µM izobutilmetilksantin ve 5 µg/ml insülin) eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına ise büyüme besiyeri eklenmiştir. Üç hafta sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri toplanıp PBS ile yıkanmış, ardından yağ hücrelerine farklılaşması beklenen hücreler 1 ml %10 formol ile fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından kuyucuklara 500 µl Oil Red O boyası eklenerek 10 dakika beklenmiş, sonra distile su ile 2 kere yıkanmıştır. Dijital görüntüleme sistemi ile adipojenik farklılaşmaya ait fotoğraflar elde edilmiştir.

4.2.3.3.2. Osteojenik Farklılaştırma

Pasaj 2 MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekilerek çoğaltılmış (pasaj 3'e geçilmiştir) ve haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır. Ardından tüm kuyucuklar 1'er ml PBS ile yıkanmış ve kemik hücrelerine farklılaşması istenen hücreleri içeren kuyucuklara 2 ml osteojenik farklılaşma besiyeri (DMEM-LG, %10 serum, 100 nM deksametazon, 10 mM beta gliserofosfat ve 0,2 mM L-askorbik asit) eklenmiş, kontrol kuyucuklarına ise büyüme besiyeri eklenmiştir. 3 hafta sonunda tüm kuyucuklardan besiyerleri toplanmış, 1 ml PBS ile yıkama yapılmıştır. Farklılaşma analizi için %10 formol ile 20 dakika fikse edilen hücrelerin üzerine 1 ml Alizarin Red boyası

eklenerek 10 dakika bekletilmiştir. Ardından boya toplanarak kuyucuklar 1 ml distile su ile yıkanmış ve dijital görüntüleme sistemi ile kuyucukların fotoğrafları çekilmiştir.

4.2.4. MKH'LERİN DONDURULUP SAKLANMASI

Kültür işlemleri tamamlandıktan sonra karakterizasyonu yapılan MKH'ler steril kazıyıcı ile kazınarak kültür kabının tabanından ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanmış, daha sonra soğuk PBS ile yıkanan MKH'ler 15 cm'lik falkon tüplerde -80 °C de dondurularak RNA izolasyonu için saklanmıştır.

4.2.5. RNA İZOLASYONU

MKH'lerden RNA izolasyonu Qiagen miRNeasy Mini Kit ile (Katalog No: 217004) yapılmıştır. MKH hücre pelletleri qiazol içinde inkübe edilmiş, ardından kloroform eklenip santrifüj yapılmıştır. En üstteki faz yeni bir tüpe alındıktan sonra elde edilen hacmin 1,5 katı %100 etanol eklenip tüm örnek 2 ml'lik toplama tüpü içeren kolona aktarılmıştır. Kolon, RWT ve RPE buffer ile yıkandıktan sonra 30-50 µl RNaz içermeyen distile su eklenmiş ve santrifüj sonunda kolonda tutunan RNA'lar 1,5 ml'lik RNaz içermeyen tüpe toplanmıştır.

4.2.6. RNA MİKTARININ BELİRLENMESİ

İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) spektrofotometre ile belirlenmiştir. RNA miktarı 1 µl'deki nanogram (ng) cinsinden elde edilir. Nükleik asitler (DNA ve RNA) 260 nm dalga boyunda, proteinler 280 nm dalga boyunda, fenol gibi organik bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Bu nedenle RNA saflığı için A260/A280 ve A260/A230 oranları dikkate alınmaktadır. Bu çalışmada mümkün olduğunca optimum oranlara sahip RNA'lar kullanılmıştır.

4.2.7. RNA BÜTÜNLÜĞÜNÜN KONTROLÜ

4.2.7.1. Agaroz Jel Elektrofrez

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük kontrolü için örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanma şekilleri aşağıdaki gibidir.

4.2.7.2. Reaktifler

4.2.7.2.1. 5X TBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA)

54 g TRIS Base (Sigma, 0826-1KG), 27,5 g Borik Asit (Sigma, 0588-1KG) ve 20 ml 0,5 M EDTA'nın (pH=8,0) (Sigma, E9884) 800–900 ml deiyonize su (ddH₂O) içerisinde çözülmesi sağlanmış ve daha sonra 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 5X TBE stok solüsyonu olarak kullanılmıştır. 5X TBE'nin deiyonize su ile 1/5 oranında sulandırılması ile hazırlanan 1X TBE ise çalışma solüsyonu olarak agaroz jel hazırlamada ve elektrofrez tamponu olarak RNA örneklerinin bütünlük analizinde kullanılmıştır.

4.2.7.2.2. DNA Ladder (100 Bç DNA Ladder)

Gene ruler 100 bç DNA ladder plus (Fermentas, SM0321) üzerine 166 µl 6X yükleme boyası (Fermentas, R0611) ve 734 µl distile su ilave edilmiş ve vorteks yardımı ile karıştırılmıştır.

4.2.7.2.3. %1'lik Agaroz Jel Hazırlanması

1 g agaroz (Lonza, 50004) hassas terazi (Shimadzu, BX320H) ile tartılmış ve üzerine 100 ml 1X TBE eklenmiştir. %1'lik olarak hazırlanan agaroz mikrodalga fırın (Vestel) yardımı ile çözülmüş, çeker ocak altına alınan agarozun el yakmayacak kadar soğuması beklendikten sonra 1 µl etidyum bromür (10 mg/ml) (SNP Biyoteknoloji, SNPEB-5) eklenip boyanın homojen dağılması için karıştırılmıştır. Hazırlanan agaroz-boya karışımı kuyuların oluşması için önceden tarak yerleştirilmiş jel tablasına dikkatlice dökülmüştür. Dökme sırasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilmiş ve hazırlanan jelin katılaşması için 20-30 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir.

4.2.7.2.4. %1'lik Agaroz Jelde RNA Örneklerinin Yürütülmesi

Hazırlanan %1'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Clever Sci.) yerleştirilmiştir. Jel'deki ilk kuyuya DNA ladder yüklenmiş, 8 µl RNA örnekleri 2 µl 6X yükleme boyası (Fermantas, R0611) ile karıştırıldıktan sonra pipet yardımıyla jeldeki diğer kuyulara yüklenmiştir. Jele yükleme yapılırken yüklemenin yapıldığı kuyularda hava kabarcığı olmamasına ve yüklenen boya-jel karışımının kuyulardan taşmamasına dikkat edilmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra örnekler 90 voltta 30 dakika yürütülmüş ve yürütme sonunda görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) aktarılmıştır. Burada GeneSnap (v6.08.04) yazılımı ile UV ışık altında görüntülenerek elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü bütünlük ve DNA kontaminasyonu açısından değerlendirilmiştir.

4.2.8. MİKRODİZİN ÇALIŞMASININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

RNA izolasyonu yapılan 12 AML, 10 MDS ve 8 sağlıklı kontrolün mikrodizin (Agilent microarray) analizi yapılmıştır. Mikrodizin çalışması için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır;

- 1) Kullanılacak RNA'nın hazırlanışı
- 2) Spike in solusyonun hazırlanması
- 3) Örnek etiketlenmesi ve hibridizasyon
 - a) Defosforilasyon
 - b) Denatürasyon
 - c) Etiketleme reaksiyonunun hazırlanması
 - d) Örneklerin kurutulması
 - e) Hibridizasyon solusyonunun hazırlanışı
 - f) Örneklerin hibridizasyona hazırlanışı
- 4) Mikrodizin yıkama
- 5) Tarama

Her bir örnekten 50 ng RNA kullanılmıştır. İlk olarak spike in kontroller, daha sonra RNA için kullanılacak hibridizasyon etiketleme reaksiyonu hazırlanmıştır. Etiketleme reaksiyonu T4 RNA Ligaz enzimi kullanılarak elde edilmiş ve hibridizasyon için kullanılmıştır. Hibridizasyon işlemi 65 °C'de 20 rpm hızında dönen fırında en az 20 saat

bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından Scan Control ve Agilent Feature Extraction programları kullanılarak tarama işlemi gerçekleştirilmiştir.

4.2.9. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİ

Bu çalışmada normalizasyon işlemleri ile normalizasyon sonrası işlemler için (istatistiksel analizler) “Microsoft Excel” eklentisi olarak mikrodizin analizi yapılmasına olanak sağlayan BRB-Array Tools (v4.3.2) (332) yazılımı kullanılmıştır.

4.2.9.1. Normalizasyon

Mikrodizin miRNA ifade verisi quantile normalizasyon metodu kullanılarak normalize edilmiştir. Normalizasyon teknik farklardan dolayı ortaya çıkabilecek farklılıkları (spesifik olmayan bağlanma, yıkama ve boyama aşamasından kaynaklanabilecek farklılıklar, arka plan gürültüsü gibi) eleyerek biyolojik veri üzerindeki gerçek farklılıkların ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır.

4.2.9.2. İstatistiksel Analizler

4.2.9.2.1. Anlamlı Olarak Farklılık Gösteren MiRNA’ların Belirlenmesi

Yüklenen veri “AML”, “MDS” ve “sağlıklı kontrol (SK)” olmak üzere 3 gruptan oluşmaktadır. AML grubu 12 bireyden, MDS grubu 10 bireyden, SK grubu ise 8 bireyden oluşmaktadır. Örnekler (AML-MDS, AML-SK ve MDS-SK arasında) program içindeki sınıf karşılaştırması (Class Comparison) komutu (t-test) ile kıyaslanmıştır ve 3 karşılaştırma için 1,5 kat üzeri değişiklik gösteren miRNA’lar tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

4.2.9.2.2. Kümeleme Analizi

İstatistiksel olarak anlamlı 1,5 kat ve üzeri değişiklik gösteren miRNA’lar kümeleme analizine alınmıştır. Analizde “Average linkage” metodu ile örnekler 1,5 kat ve üzeri değişiklik gösteren miRNA’lara göre hiyerarşik olarak kümelenebilirlerdir. Çalışmada kümeleme analizi için Cluster (v3.0) (<http://bonsai.ims.utokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/>) (333) programı, kümeleme analiz sonucunun görüntülenmesi için ise Java TreeView (v1.1.6r4) (334) programı kullanılmıştır.

4.2.10. MİRNA'LARIN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI

Biyoinformatik analizler sonucunda anlamlı farklılık gösteren miRNA'lar eş zamanlı PZR yöntemi ile doğrulanmıştır.

4.2.10.1. MiRNA'lardan Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA kullanılarak yapılan cDNA sentez reaksiyonlarında mRNA'yı total RNA'dan ayırmak için mRNA'nın 3' ucunda bulunan poly (A) kuyruğu kullanılır ve oligo (dT) primeri poly (A) kuyruğuna hedef olarak kullanılarak total RNA'nın içinde bulunan mRNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenir. Olgun miRNA'ların 3' uçlarında poly (A) kuyruğu bulunmamaktadır ve bu durum klasik bir cDNA sentezinin yapılmasını engellemektedir. miRNA'lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır. Kit ile öncelikle miRNA'ların 3' uçlarına poly (A) kuyruğunu da içeren bir "universal tag" eklenmiştir. Bu ek hem cDNA sentezi için kullanılacak primer dizisini içermekte hem de miRNA'nın boyunu eş zamanlı PZR için yeterli uzunluğa getirmektedir. Bir sonraki basamakta universal tag'e özel bir primer kullanılarak cDNA sentez reaksiyonu üreticinin yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

4.2.10.2. Mikrodizin Analizi Sonucu Seçilen MiRNA'ların İfade Farklılığının Eş Zamanlı PZR ile Doğrulanması

İfade farklılıkları gösteren miRNA'ların doğrulama çalışması eş zamanlı PZR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten elde edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmış ve PZR sonucunda elde edilecek ifadeler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. miRNA'lara özel ileri primerler cDNA sentezi kitlerine uyumlu olarak ilgili firma tarafından sağlanmıştır. Geri primer olarak cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan universal tag'e tamamlayıcı olan universal primer kullanılmıştır. Bu kitler laboratuvarımızda bulunan LightCycler® 480 (Roche, 05015243001) platformu ile uyumludur. miRNA ifadelerinin analizleri için referans gen kullanmak yerine eş zamanlı PZR çalışmasında kullanılan tüm miRNA'ların Ct değerlerinin ortalamaları hesaplanmış ve her bir miRNA bu ortalama değer ile normalize edilmiştir (365). Analiz yöntemi olarak, yaklaşım yöntemi olarak da adlandırılan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (335) kullanılmıştır.

4.2.11. MİRNA HEDEF GENLERİNİN BELİRLENMESİ

miRNA hedef genlerinin bulunması için pek çok biyoinformatik araç bulunmaktadır. Bu çalışmada miRNA hedef genleri bulunurken miRWalk (<http://www.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>) (336) veritabanı kullanılmıştır.

4.2.12. YOLAK ANALİZLERİ

Her miRNA'ya ait hedef genlerin hangi yolaklarda bulunduğu yine WebGestalt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) veritabanı kullanılarak tespit edilmiştir.

4.2.13. MİRNA HEDEF GENLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASI VE DICER1 GENİNİN İFADE ANALİZİ

4.2.13.1. mRNA'lardan Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

mRNA'dan cDNA sentezi klasik yöntem olan oligo(dT) primeri kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Roche).

4.2.13.2. Seçilen mRNA'ların İfade Farklılığının ve DICER1 Geninin Eş Zamanlı PZR Yöntemi ile Araştırılması

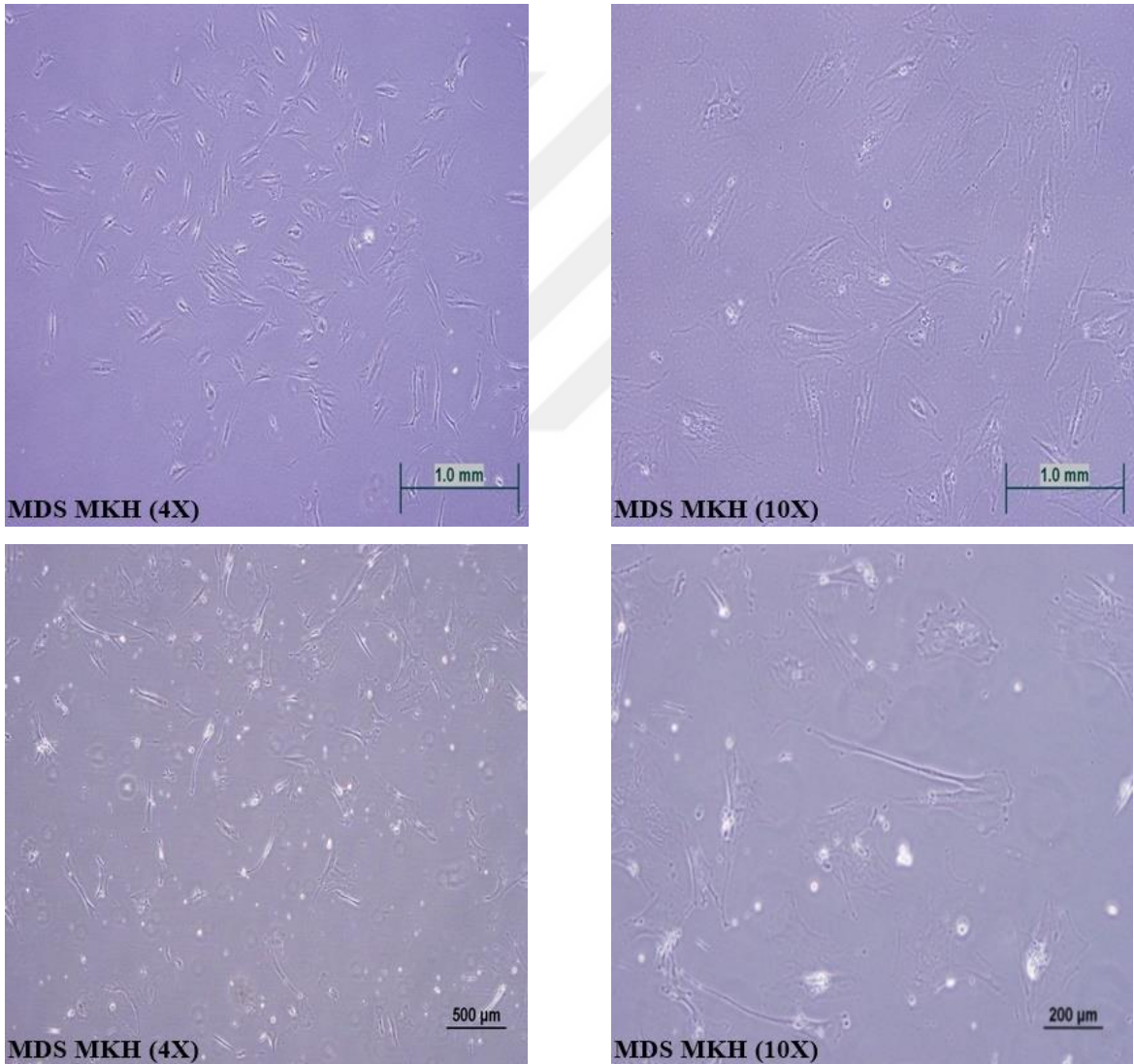
mRNA'ları doğrulama çalışması ve DICER1 geninin ifade analizi eş zamanlı PZR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten elde edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmış ve gene özgü primerler kullanılarak PZR reaksiyonu kurulmuştur. PZR sonucunda elde edilen ifadeler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. mRNA ifade analizleri için normalizasyon geni olarak ACTB kullanılmıştır ve sonuçların analizi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (335) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

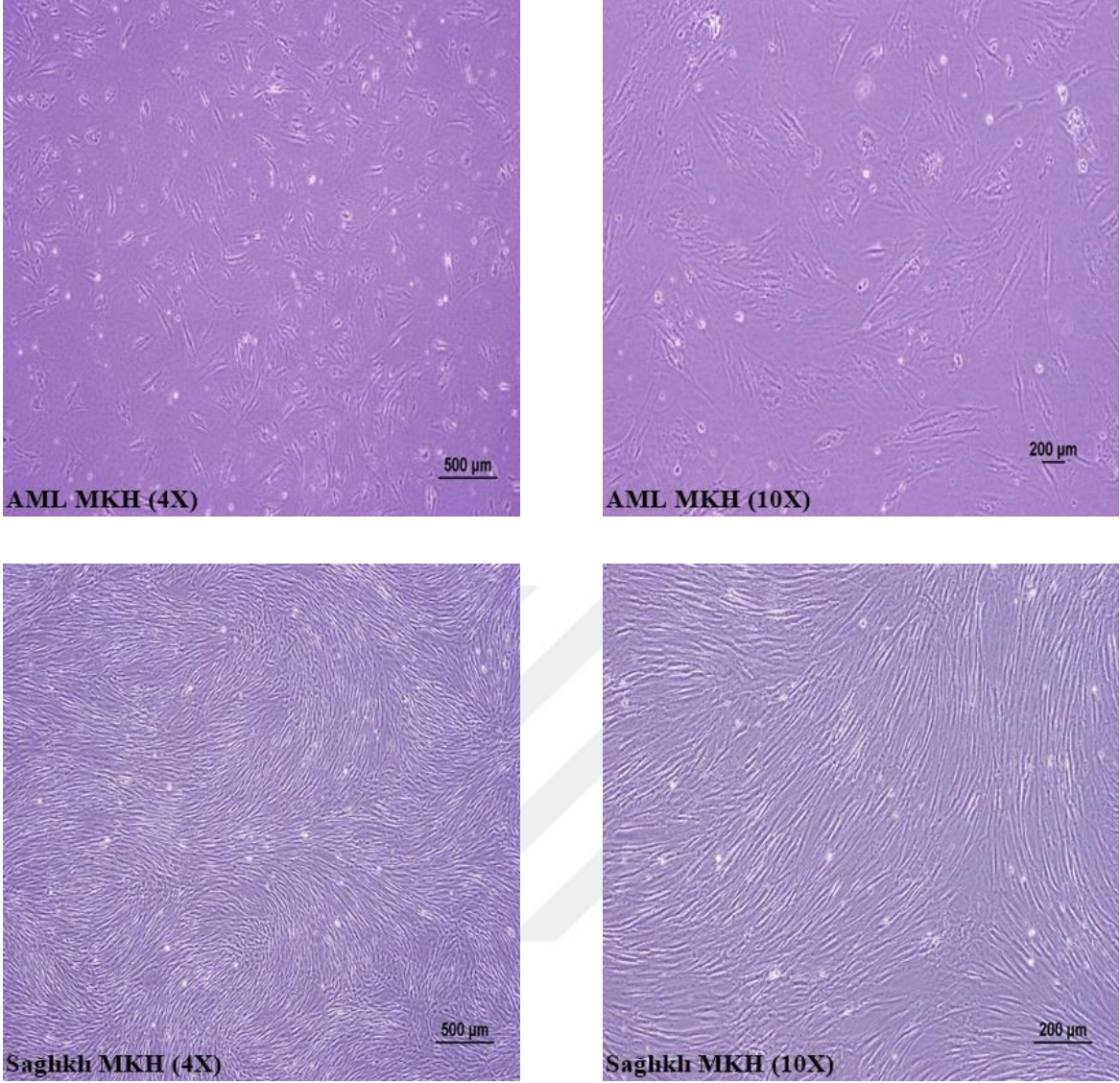
5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. MKH'LERİN KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR

5.1.1. MORFOLOJİK ANALİZLER

MKH'lerin karakterizasyonunda ilk adım olarak hücrelerin plastik yüzeye yapışabilmeleri ve iğsi-poligonal morfoloji göstermelerinin tespiti yapılmıştır. Bu özelliklerinin saptanması ters (inverted) mikroskop kullanılarak yapılmış olup hasta ve sağlıklı kontrol MKH'lerinin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 5.1).





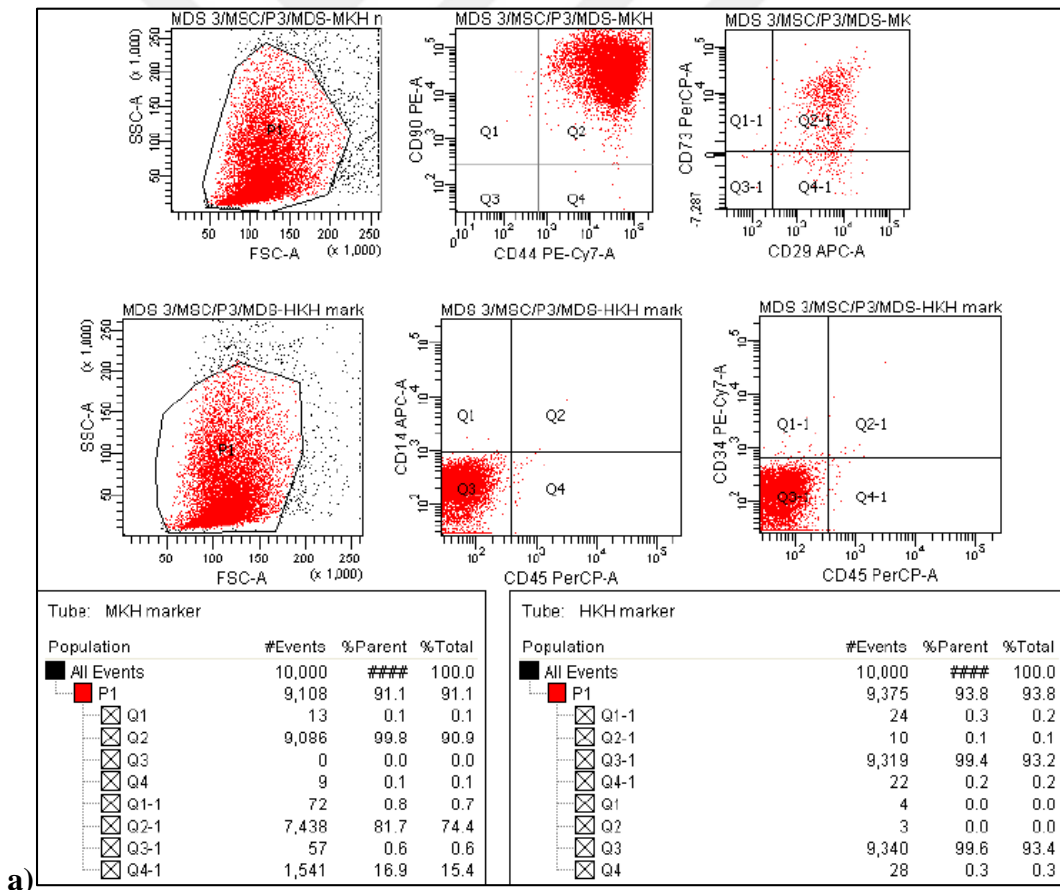
Şekil 5.1. Kültür edilmiş MDS/AML ve sağlıklı kontrol kemik iliği MKH'lerinin mikroskop altındaki görüntüsü (4X ve 10X Büyütme). MDS ve AML MKH'lerinde sağlıklı kontrollere göre daha az üreme görülmektedir.

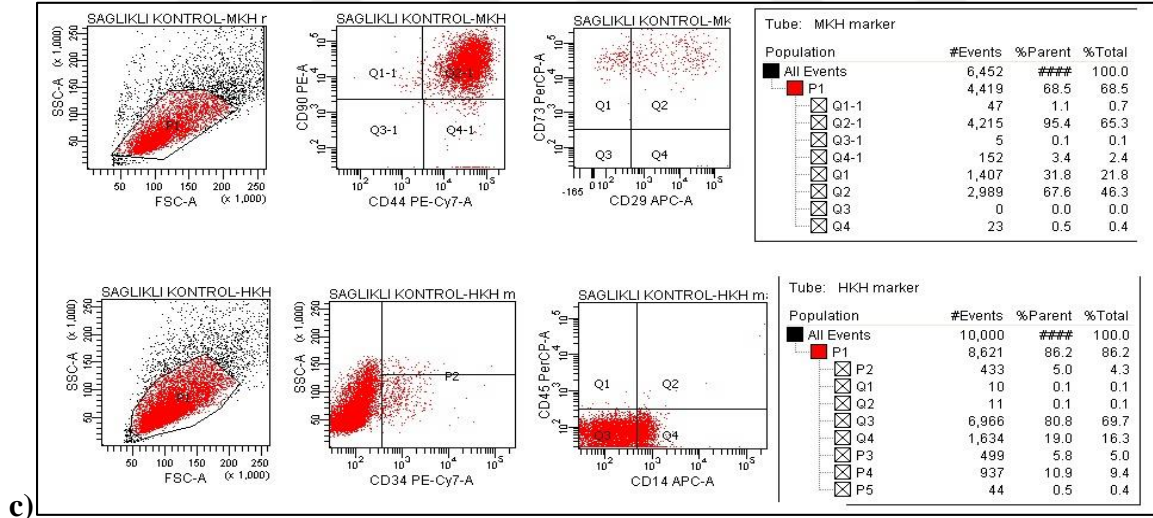
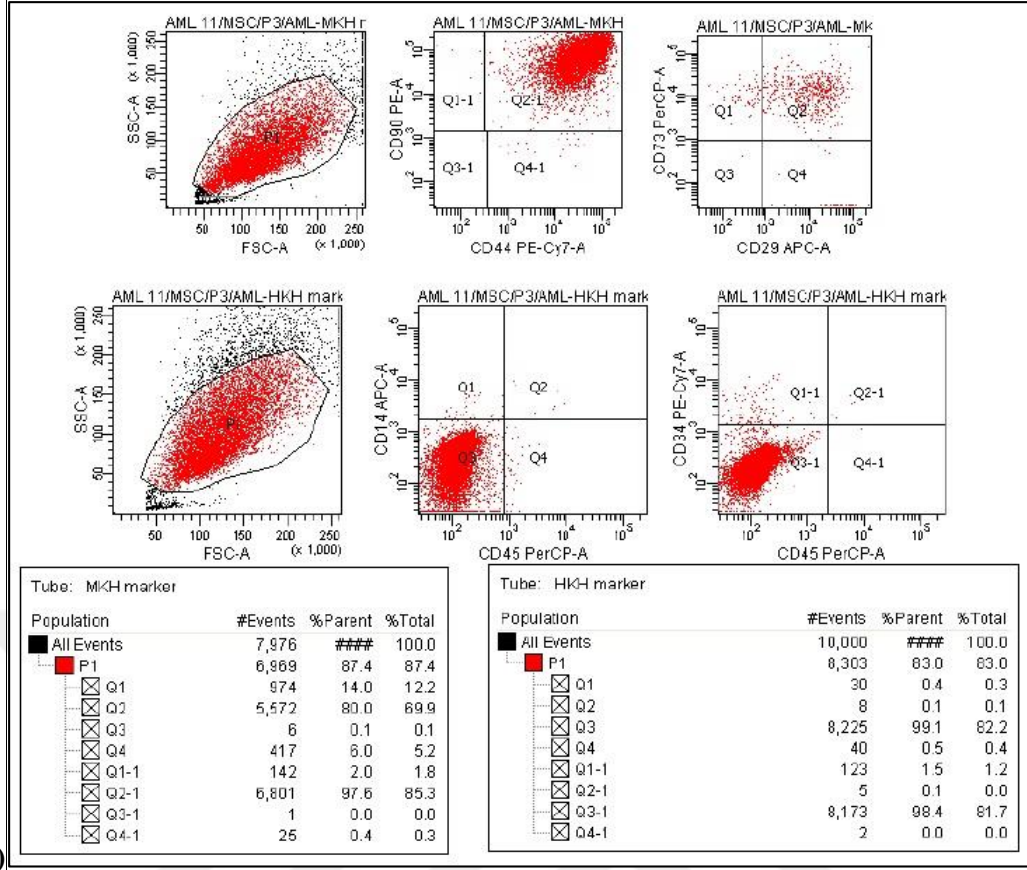
Hücre kültür işlemlerinde ve morfolojik analizler sonucunda dikkati çeken önemli bir nokta; MDS MKH'lerinin sağlıklı kontrol MKH'lerine göre hücrelerin flaskı kaplama yüzdesinin çok daha düşük olması (%30-50), sağlıklı MKH'lere göre özellikle ileriki pasajlarda (pasaj 2 ve 3) daha yavaş çoğalması, daha kısa sürede yaşlılık aşamasına geçerek bölünmelerini tamamlaması ve hücrelerin ölmesi, daha geniş, düzensiz biçimde değişik şekillerde ve granüllü olmak üzere daha farklı morfoloji göstermeleri olmuştur. AML MKH'leri morfolojik olarak MDS MKH'leri ile karşılaştırıldığında; AML MKH'lerinin MDS MKH'lerine oranla daha düzgün, iğimsi morfoloji gösterdikleri,

çoğalmaları bakımından ise AML MKH'lerinin MDS MKH'lerine göre çoğalmalarının biraz daha iyi olduğu tespit edilmiştir. AML MKH'leri sağlıklı kontrol MKH'leri ile karşılaştırıldığında; AML MKH'lerinin daha yavaş çoğaldıkları ve hücrelerin flaskı kaplama sürelerinin sağlıklı kontrollere göre daha uzun olduğu, hücrelerin flaskı kaplama yüzdesinin düşük olduğu (%40-60), morfolojik olarak karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol MKH'lerinin daha iğimsi, ince ve daha az granüllü morfoloji gösterirken çoğu AML örneğindeki MKH'lerin özellikle ileriki pasajlarda (pasaj 2 ve 3) daha kalın, daha küt ve daha granüllü, yaşlanmış hücre morfolojisi gösterdikleri tespit edilmiştir.

5.1.2. YÜZEY MOLEKÜL ANALİZİ BULGULARI

Yüzey molekül analizi sonucunda MDS/AML ve sağlıklı kontrol örneklerinin MKH yüzey belirteçleri (CD 73, CD 90, CD44, CD29) pozitif çıkarken HKH belirteçleri (CD 34, CD 45, CD14) negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.2).





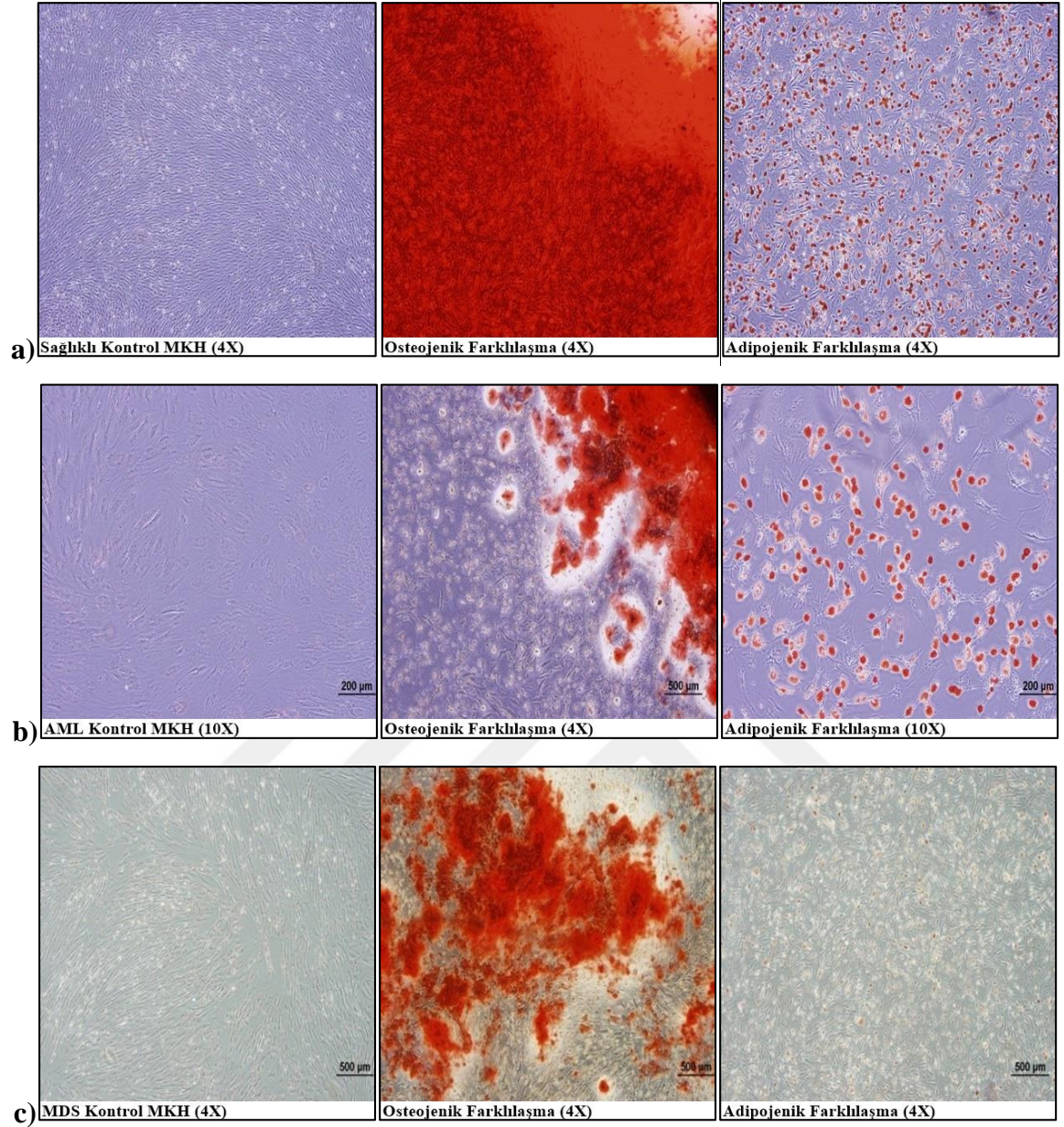
Şekil 5.2. Hasta ve sağlıklı kontrol MKH'lerinin akım sitometri ile karakterizasyonu. a) MDS, b) AML ve c) Sağlıklı kontrol MKH'lerinin akım sitometri ile karakterizasyonu sonuçlarını göstermektedir. Analizi yapılan örneklerin MKH yüzey belirteçleri (CD 73, CD 90, CD44, CD29) pozitif çıkarken HKH belirteçleri (CD 34, CD 45, CD14) negatif olarak tespit edilmiştir.

5.1.3. FARKLILAŞMA ANALİZİ BULGULARI

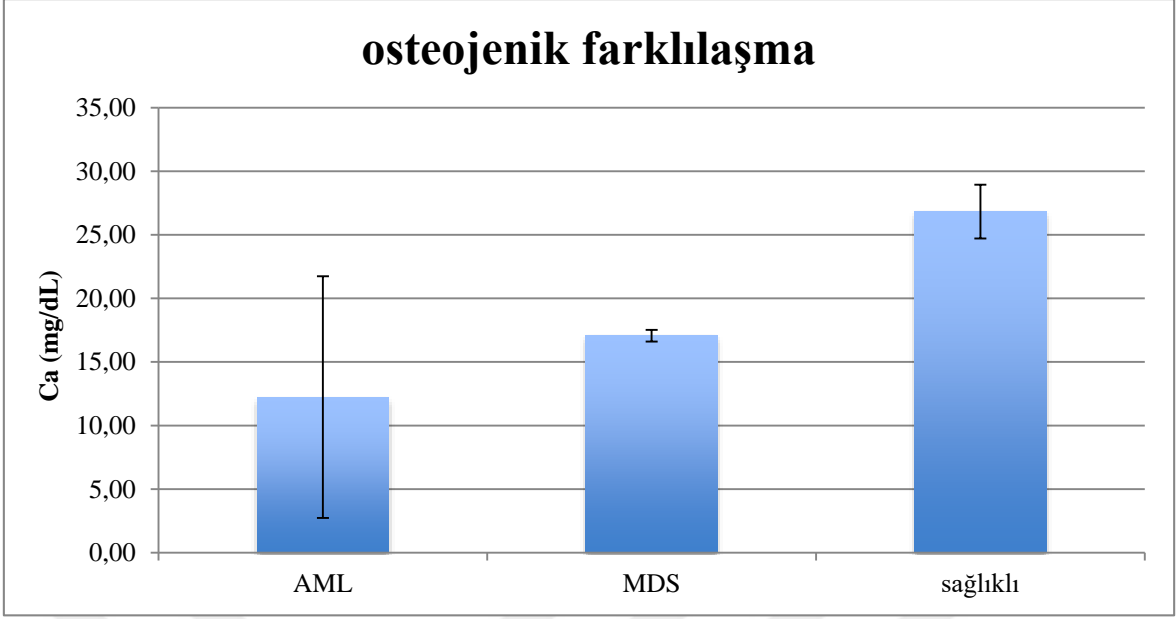
Farklılaşma analizlerinde MKH'lerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri değerlendirilmiş olup, örneklerin çoğunluğunda farklılaşma açısından herhangi bir sorun ile karşılaşmamıştır. MDS, AML hastalarının ve sağlıklı kontrollerin kemik iliklerinden elde edilen MKH'ler ile yapılan farklılaşma analizlerinde MKH'lerin yağ ve kemik hücrelerine farklılaştıkları saptanmıştır. Fakat hasta ve sağlıklı örneklerin farklılaşma sonuçlarının mikroskop altındaki görüntülerine ve kantitatif analiz sonuçlarına göre MDS/AML MKH'lerinin sağlıklı kontrollere göre adipojenik ve özellikle osteojenik farklılaşmalarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 5.3, Şekil 5.4, Şekil 5.5, Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Farklılaşma analizi yapılabilen bazı örneklerin kantitatif ölçüm sonuçları.

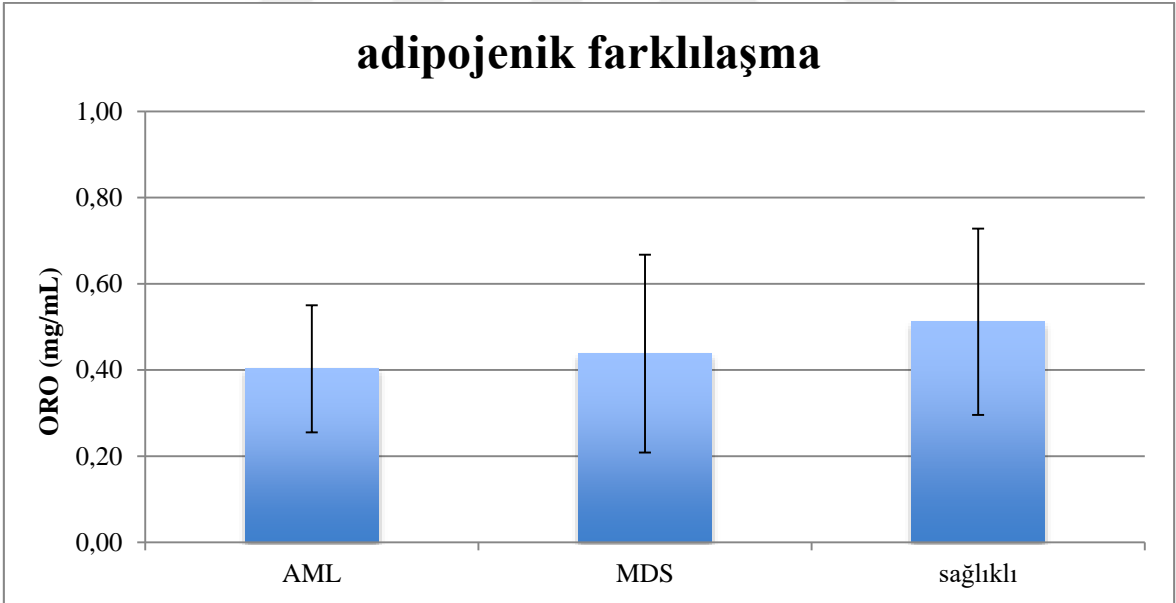
Tanı	Pasaj	Osteo Kontrol (mg/dL)	Adipo Kontrol (mg/mL)	Osteo (mg/dL)	Adipo (mg/mL)
AML	P3	0.56	0.27	29.23	0.24
AML	P3	-	0.18	-	0.32
AML	P3	-	0.13	-	0.46
AML	P3	-	0.2	-	0.41
AML	P3	-1.47	0.14	18.03	0.31
AML	P3	-	0.21	-	0.48
AML	P3	0.25	0.33	13.66	0.74
AML	P3	0.07	0.19	0.77	0.46
AML	P3	0	0.2	10.6	0.47
AML	P3	0	0.24	3.4	0.34
AML	P3	0	0.2	9.97	0.2
MDS	P3	-	0.19	-	0.16
MDS	P3	-	0.2	-	0.43
MDS	P3	-	0.33	-	0.28
MDS	P3	-3.01	0.59	17.39	0.59
MDS	P3	-1.23	0.68	16.74	0.73
Sağlıklı	P3	0	0.12	27.85	0.84
Sağlıklı	P3	0.06	0	25.8	0.51
Sağlıklı	P3		0.27		0.31
Sağlıklı	P3		0.24		0.57
Sağlıklı	P3		0.18		0.33
Sağlıklı	P3	-0.06	0.14	23.62	0.27



Şekil 5.3. Osteojenik ve adipojenik farklılaşma gösteren sağlıklı kontrol, AML ve MDS MKH'lerinin mikroskop görüntüleri (4X ve 10X büyütme). a) Sağlıklı kontrol, b) AML, c) MDS MKH'lerinin osteojenik ve adipojenik farklılaşma analiz sonuçlarını göstermektedir. Sağlıklı ve AML/MDS kemik iliği MKH'lerinin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabildikleri görülmektedir. Osteojenik farklılaşma gösteren hücreler alizarin red boyası ile, adipojenik farklılaşma gösteren hücreler oil red o ile boyanmıştır.



Şekil 5.4. Hasta ve sağlıklı kontrollerin kantitatif osteojenik farklılaşma sonuçlarını gösteren sütun grafiği. MDS/AML MKH'lerinin kantitatif olarak osteojenik farklılaşma kapasitelerinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı görülmektedir. Osteojenik farklılaşma sağlıklı kontrollerden MDS'ye ve MDS'den AML'ye doğru kademeli azalma göstermektedir.



Şekil 5.5. Hasta ve sağlıklı kontrollerin kantitatif adipojenik farklılaşma sonuçlarını gösteren sütun grafiği. MDS/AML MKH'lerinin kantitatif olarak adipojenik farklılaşma kapasitelerinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı görülmektedir. Adipojenik farklılaşma sağlıklı kontrollerden MDS'ye ve MDS'den AML'ye doğru kademeli olarak azalmaktadır.

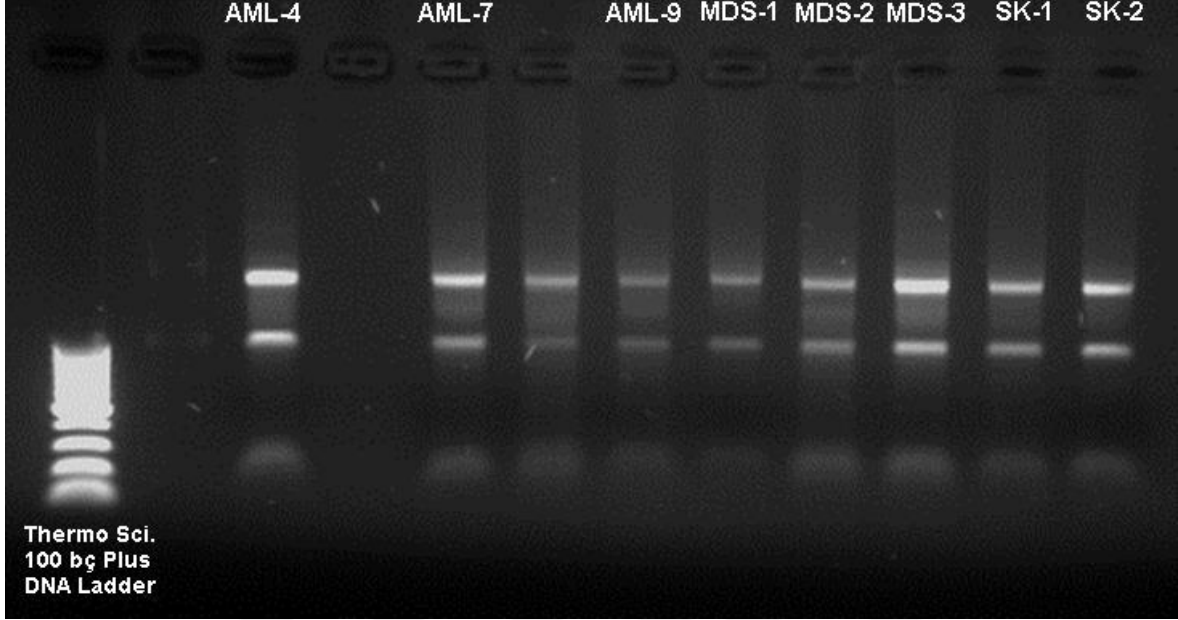
5.2. RNA İZOLASYONUNA AİT BULGULAR

İzole edilen RNA'lar NanoDrop™ 1000 cihazına yüklenerek konsantrasyonları, A₂₆₀/A₂₈₀ ve A₂₆₀/A₂₃₀ oranları tespit edilmiştir. İzole edilen RNA miktarları yapılacak çalışmalar için yeterli bulunmuştur. RNA konsantrasyonları 13,4 ile 283,1ng/μl arasında değişim göstermektedir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerleri.

Örnek No	Konsantrasyon (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
AML-4	66,1 ng/μl	1,88	0,77
AML-7	87,2 ng/μl	2,09	1,77
AML-9	20,8 ng/μl	2,13	1,27
AML-10	94,3 ng/μl	2,09	1,72
AML-11	206,6 ng/μl	2,12	1,84
AML-12	113,9 ng/μl	2,08	1,35
AML-13	224,4 ng/μl	2,06	1,68
AML-14	13,4 ng/μl	1,71	0,93
AML-17	145,1 ng/μl	2,1	1,87
AML-18	36,1 ng/μl	2,22	1,72
AML-20	70,2 ng/μl	2,00	1,17
MDS-1	55 ng/μl	1,76	1,92
MDS-2	121,9 ng/μl	2,13	1,76
MDS-3	55,8 ng/μl	2,13	1,99
MDS-4	283,1ng/μl	2,12	2,04
MDS-5	32,8 ng/μl	1,9	1,18
MDS-6	97,6 ng/μl	2,08	1,62
MDS-7	97,7 ng/μl	2,0	1,18
MDS-8	69,9 ng/μl	2,02	1,25
MDS-9	37,7 ng/μl	2,14	1,73
MDS-10	55,1 ng/μl	2,09	1,49
SK-1	86,6 ng/μl	2,06	1,69
SK-2	131,4 ng/μl	2,02	1,35
SK-3	76,1 ng/μl	2,12	1,6
SK-4	68,4 ng/μl	2,14	1,54
SK-5	58,0 ng/μl	2,14	1,4
SK-6	38,4 ng/μl	2,1	1,39
SK-8	167,5 ng/μl	2,09	1,91
SK-9	250,3 ng/μl	2,14	1,66

İzole edilen total RNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı ve 28S ile 18S rRNA bantlarının bütünlüğü kontrol edilmiştir (Şekil 5.6). Örneklerle ait total RNA'larda DNA kontaminasyonuna rastlanmamıştır. İzole edilen RNA'ların 28S ve 18S rRNA bantlarının bütünlüklerini korudukları tespit edilmiştir.

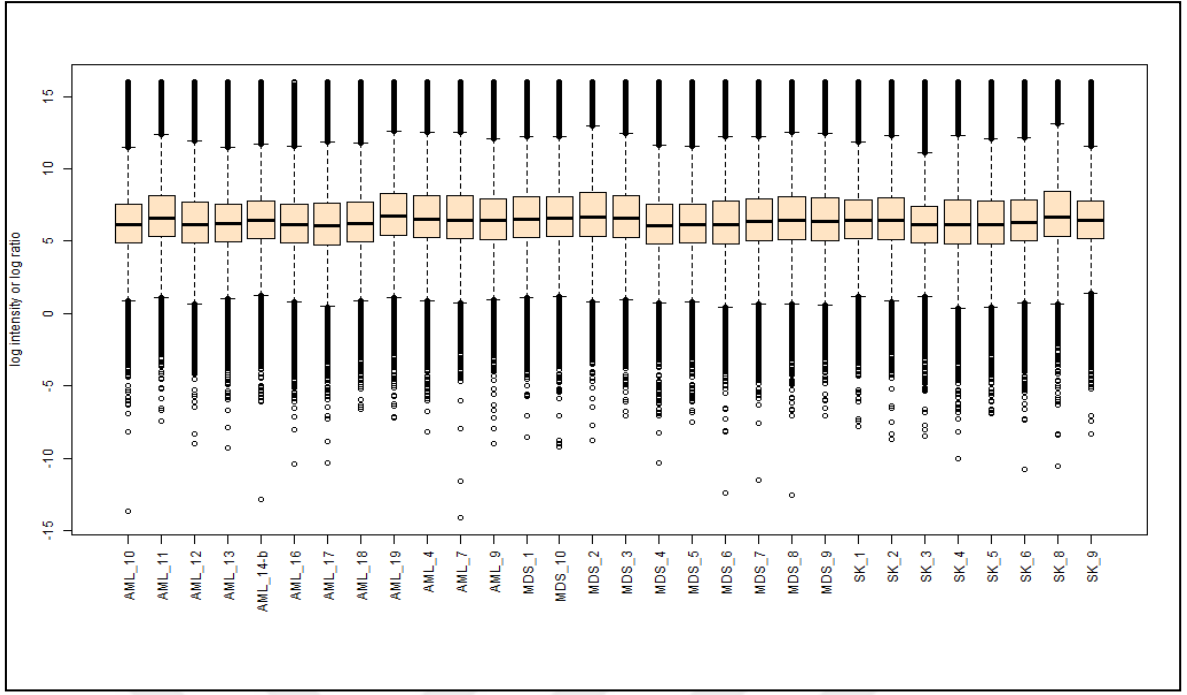


Şekil 5.6. İzole edilen total RNA'ların temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Jelde görülen 8 RNA örneğinin yüksek kalitede olduğu gözlenmektedir. 28S/18S oranı bütün örneklerde beklendiği gibi 2:1 dir.

5.3. MİKRODİZİN VERİLERİNİN ANALİZİNE AİT BULGULAR

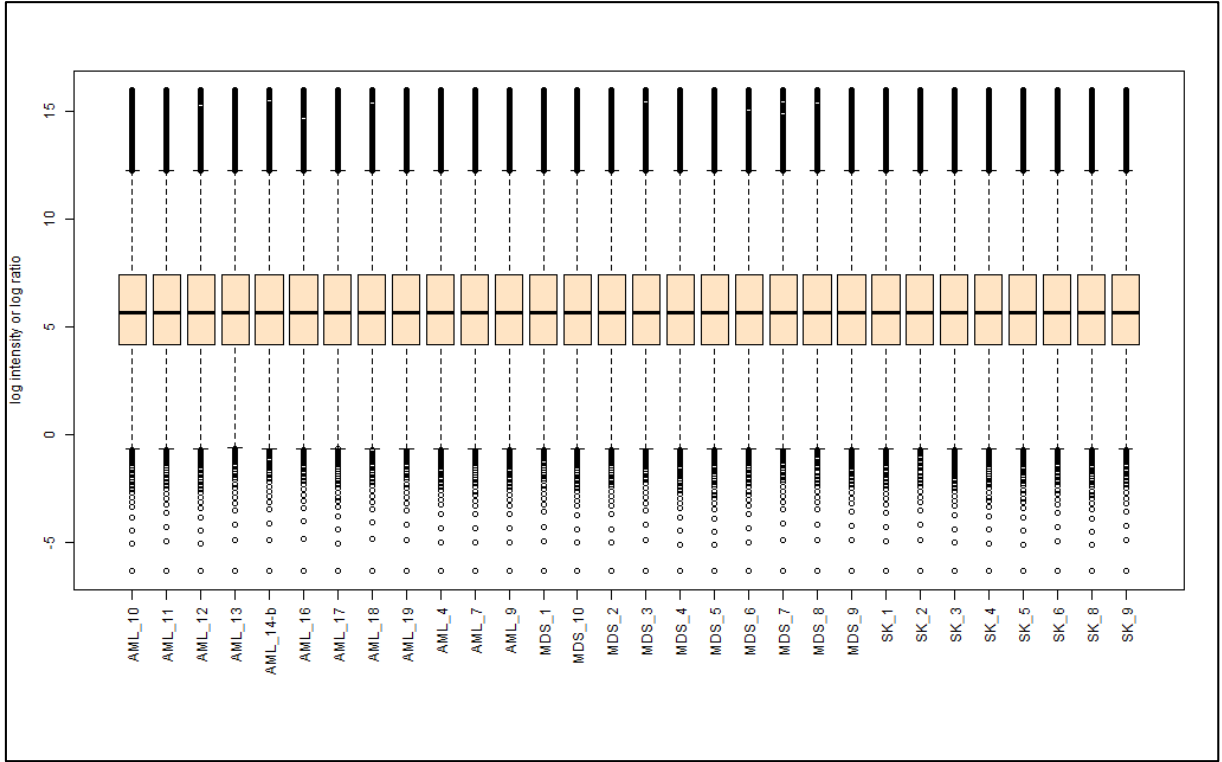
5.3.1. NORMALİZASYON ÖNCESİ VE NORMALİZASYON SONRASI BULGULAR

Teknik hatalardan dolayı verilerin medyan değerleri aynı düzlemde değildir ve bu durum verilerin karşılaştırılmasını engellemektedir. Verilerin karşılaştırılabilmesi ve biyolojik farklılıklarının ortaya çıkması için öncelikle verilerin normalizasyon işlemine tabi tutulması gerekmektedir. Çiplerin normalizasyon öncesi sinyal verilerinin kutu grafiği Şekil 5.7'de görülmektedir.



Şekil 5.7. Çiplere ait verilerin normalizasyon öncesi sinyal verilerinin kutu grafiği.

miRNA ifade verileri BRB-Array Tools programı ile normalize edilmiştir. Quantile normalizasyon sonrasında çizilen kutu grafiği ile verilerin medyan değerlerinin aynı düzleme geldiği ve çiplerin birbirleri ile kıyaslanabilir olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. Çiplere ait verilerin normalizasyon sonrası sinyal verilerinin kutu grafiği.

5.3.2. GRUPLAR ARASINDA FARKLILIK GÖSTEREN MİRNA'LAR

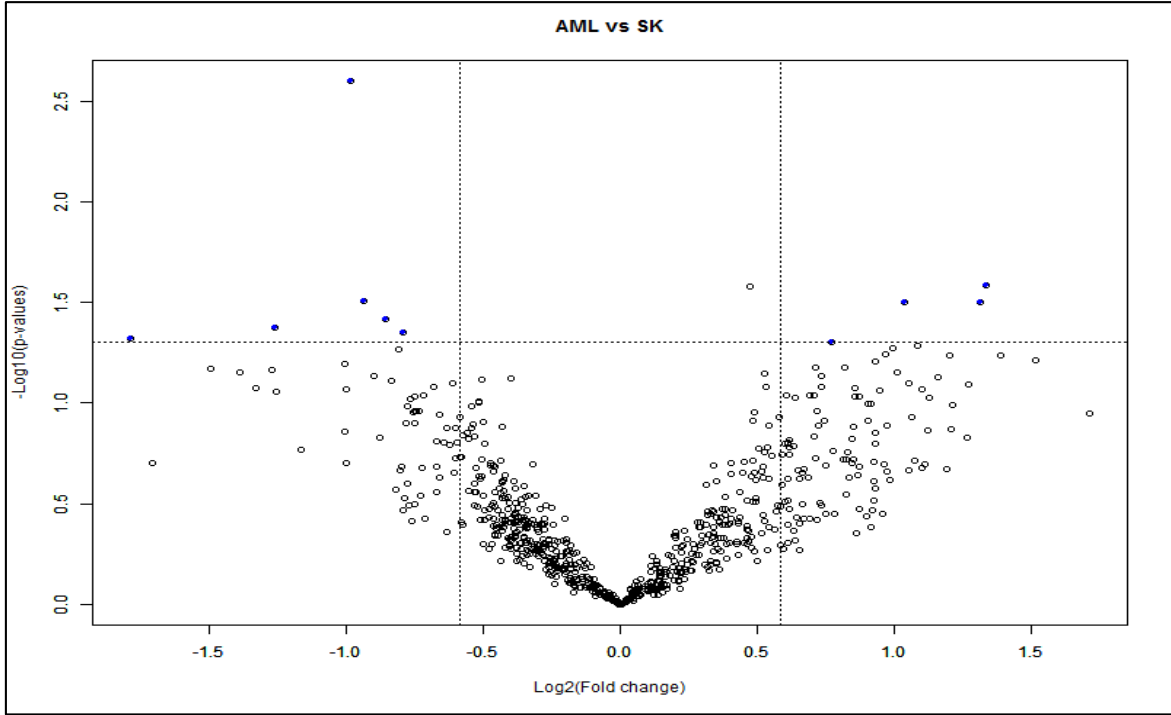
Verilerin BRB-Array Tools programı ile sınıf karşılaştırması (Class Comparison– unpaired t-test) analizi sonucunda AML-Sağlıklı kontrol karşılaştırmasında 9, MDS-Sağlıklı kontrol karşılaştırmasında 7, AML-MDS karşılaştırmasında 7 adet miRNA'nın 1,5 kat ve üzerinde anlamlı olarak ($p < 0,05$) değişim gösterdiği (arttığı ya da azaldığı) görülmüştür (Çizelge 5.3, Çizelge 5.4 ve Çizelge 5.5).

5.3.2.1. AML-SK Arasında Farklılık Gösteren MiRNA'lar

Çizelge 5.3. AML hastalarının sağlıklı kontroller ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar.

miRNA	p-değeri	Kat Değişimi
		AML/SK
hsa-miR-4485-3p	0.0025064	0.51
hsa-miR-150-3p	0.0259917	2.52
hsa-miR-1973	0.031207	0.52
hsa-miR-134-5p	0.0316092	2.05
hsa-miR-4646-3p	0.0317144	2.49
hsa-miR-1275	0.0384551	0.55
hsa-miR-4725-5p	0.0443231	0.58
hsa-miR-143-3p	0.0479706	0.29
hsa-miR-874-3p	0.0499947	1.7

Mikrodizin verilerinin analizi sonucunda AML-Sağlıklı kontrol örnekleri karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren (artan ve azalan) miRNA'lar Şekil 5.9'daki volkan grafiğinde gösterilmiştir.



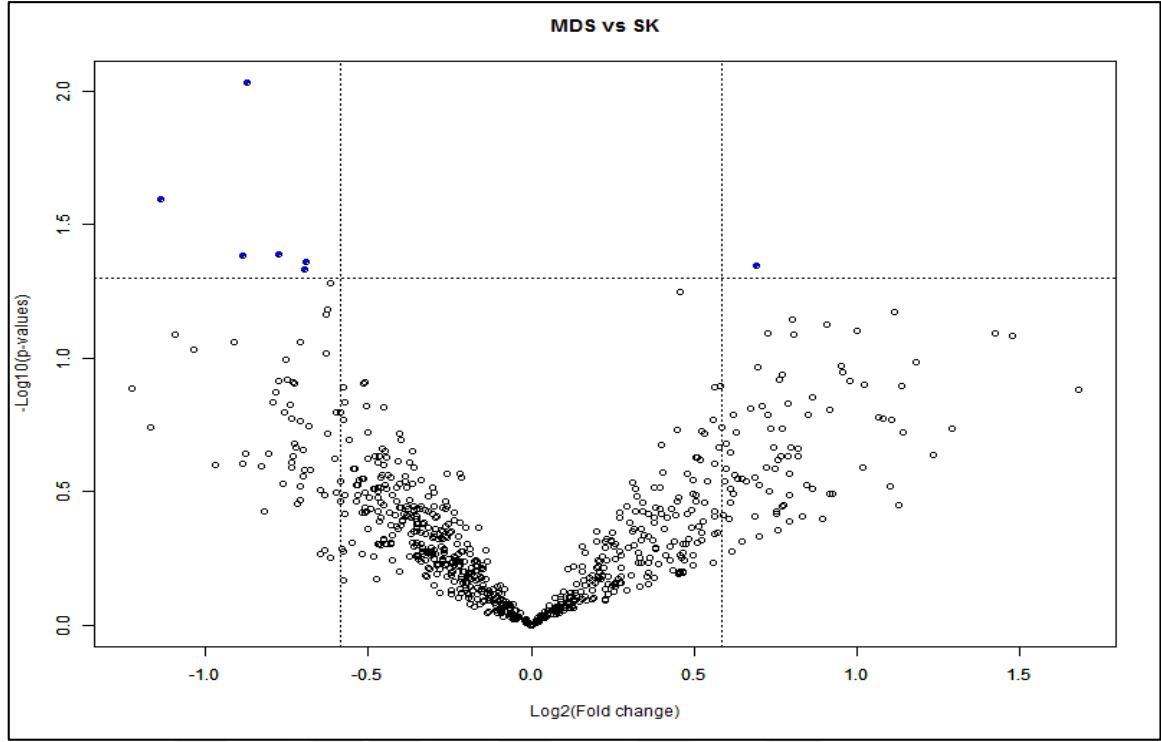
Şekil 5.9. Analiz sonucunda AML ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği. 4 miRNA'nın ifadesi AML grubunda SK grubuna göre artış gösterirken 5 miRNA'nın ifadesi azalmaktadır.

5.3.2.2. MDS-SK Arasında Farklılık Gösteren MiRNA'lar

Mikrodizin verilerinin analizi sonucunda MDS-Sağlıklı kontrol karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren (artan ve azalan) miRNA'lar Çizelge 5.4'de verilmiştir ve Şekil 5.10'daki volkan grafiğinde gösterilmiştir.

Çizelge 5.4. MDS hastalarının sağlıklı kontroller ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar.

miRNA	p-değeri	Kat Değişimi
		MDS/SK
hsa-miR-30d-5p	0.0093061	0.55
hsa-miR-5581-5p	0.0255354	0.46
hsa-miR-222-3p	0.0409792	0.58
hsa-miR-30a-3p	0.0414269	0.54
hsa-miR-6165	0.0435704	0.62
hsa-miR-4462	0.0452255	1.61
hsa-miR-1914-3p	0.0465623	0.62



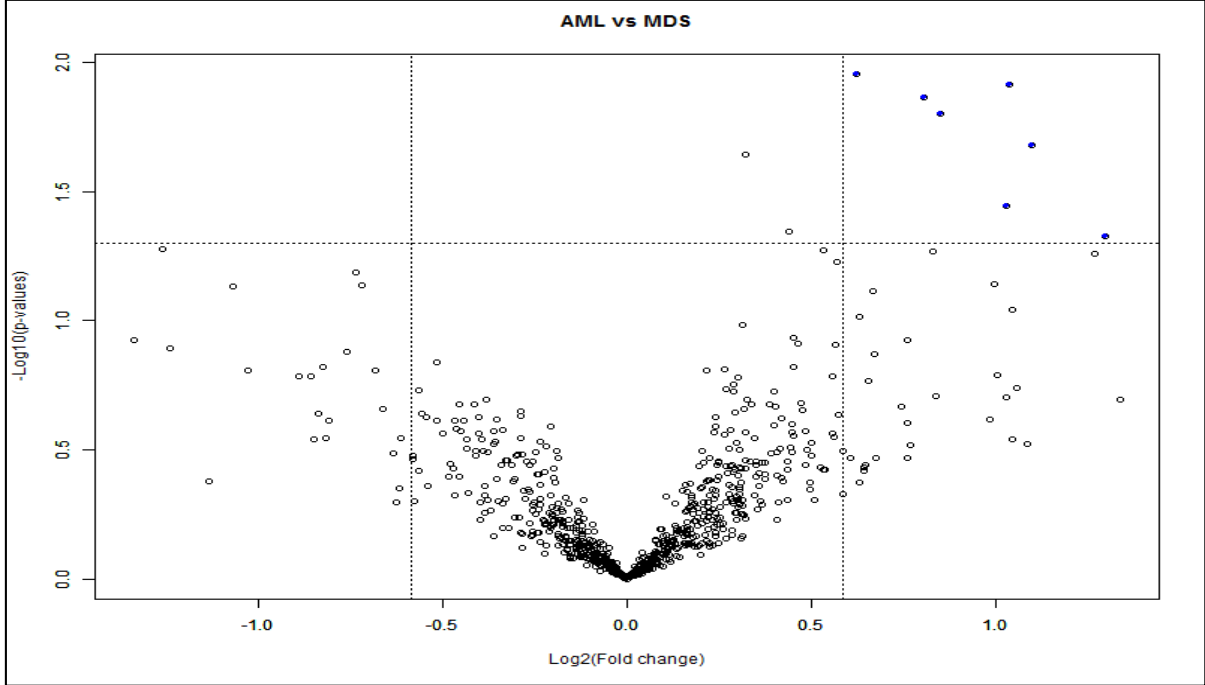
Şekil 5.10. Analiz sonucunda MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği. 1 miRNA'nın ifadesi MDS grubunda SK grubuna göre artış gösterirken 6 miRNA'nın ifadesi azalmaktadır.

5.3.2.3. AML-MDS Arasında Farklılık Gösteren MiRNA'lar

Çizelge 5.5. AML hastalarının MDS hastaları ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar.

miRNA	p-değeri	Kat Değişimi
		AML/MDS
hsa-miR-4652-3p	0.0110615	1.54
hsa-miR-33b-3p	0.0121834	2.05
hsa-let-7b-3p	0.0136083	1.75
hsa-miR-4646-3p	0.0158489	1.8
hsa-miR-324-3p	0.0208168	2.14
hsa-miR-4436b-5p	0.0360521	2.04
hsa-miR-542-5p	0.0469215	2.46

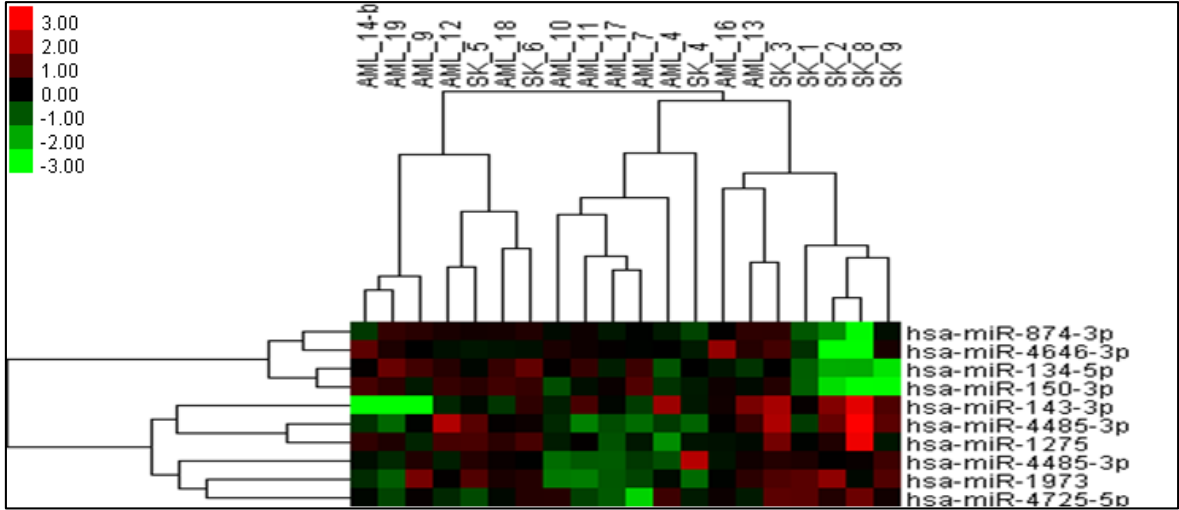
Mikrodizin verilerinin analizi sonucunda AML-MDS karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren (artan ve azalan) miRNA'lar Şekil 5.11'deki volkan grafiğinde gösterilmiştir.



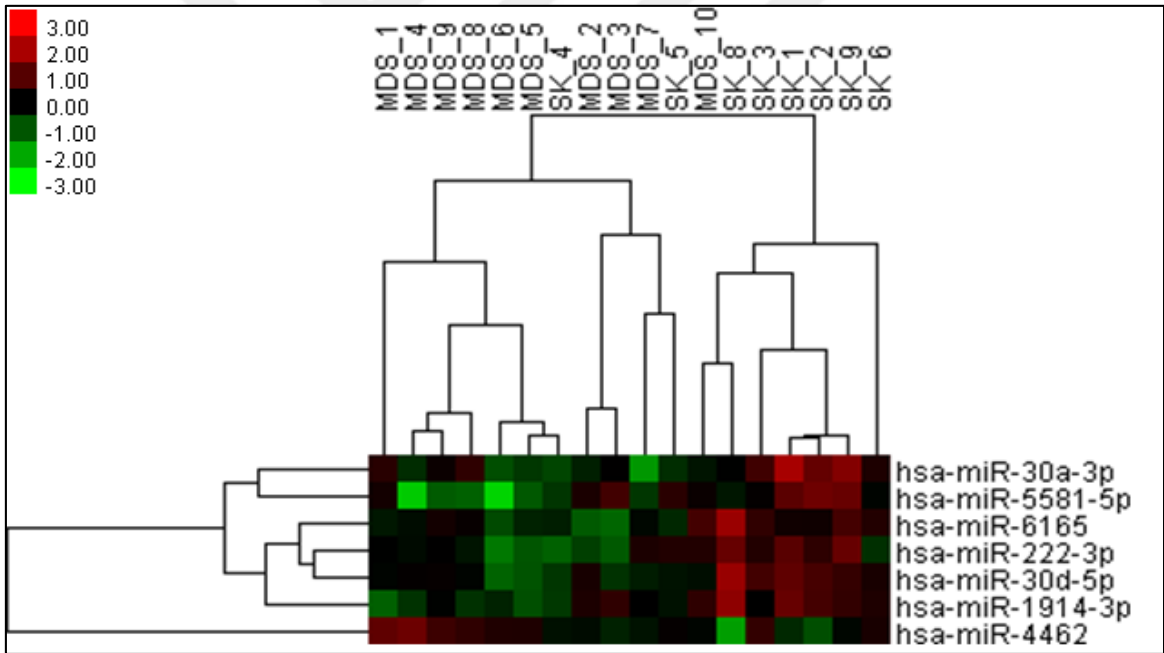
Şekil 5.11. Analiz sonucunda AML ve MDS örnekler arasında anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği. 7 miRNA'nın ifadesi AML grubunda MDS grubuna göre artış göstermektedir.

5.3.2.4. KÜMELEME ANALİZİ SONUÇLARI

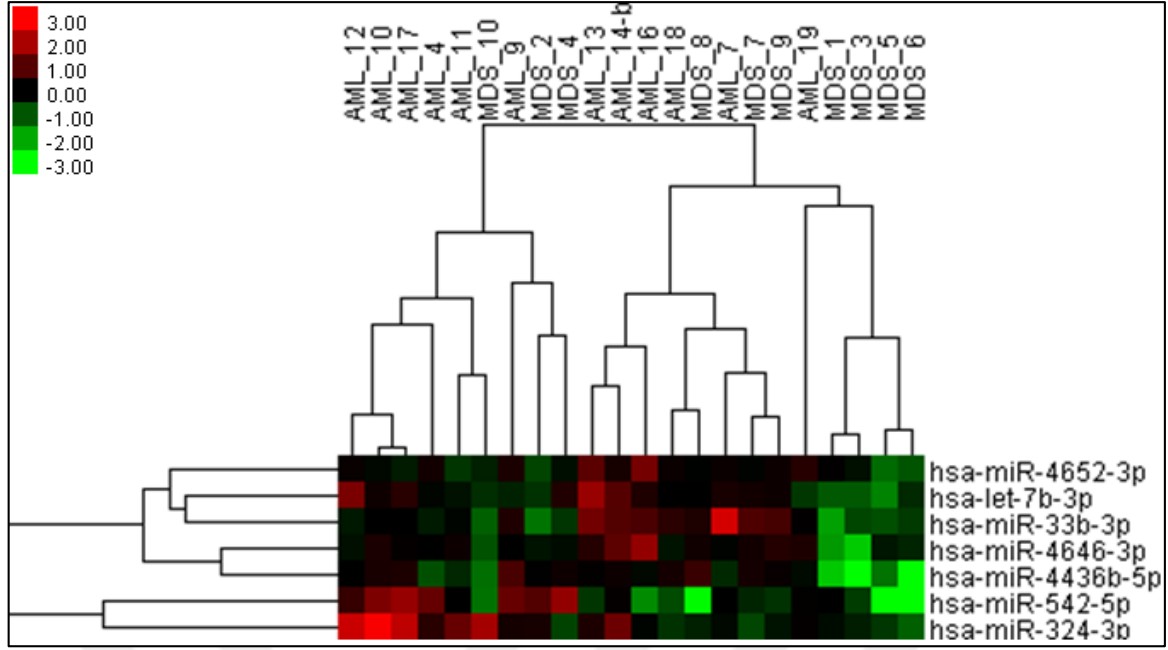
Farklılık gösteren miRNA'lar Cluster programı ile kümeleme analizine alınmıştır. Hiyerarşik kümeleme analizi sonucunda çalışmada kullanılan örneklerde ilgili miRNA'ların ifade profillerinin anlamlı olarak kümelenebilir kümelenebilirliği incelenmiştir. AML/Sağlıklı kontrol kıyaslamasında 9 adet farklılık gösteren miRNA bulunurken (Şekil 5.12), MDS/Sağlıklı kontrol kıyaslamasında 7 adet farklılık gösteren miRNA (Şekil 5.13) ve AML-MDS arasında 7 adet farklılık gösteren miRNA ile yapılan kümeleme analizi (Şekil 5.14) sonucunda bu farklılık gösteren miRNA'ların hasta ve sağlıklı kontrol örneklerini birbirinden ve AML'yi MDS'den anlamlı şekilde ayırabildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.12. Sınıf karşılaştırması sonucunda AML ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı değişiklik gösteren ($p < 0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait temsili heatmap. AML ve SK örnekler ilgili miRNA ifade profillerine göre istatistiksel olarak anlamlı kümelenebilirler (Mann-Whitney; $W = 78.5$, $p = 0.0037$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir.



Şekil 5.13. Sınıf karşılaştırması sonucunda MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri arasında anlamlı değişiklik gösteren ($p < 0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait temsili heatmap. MDS ve SK örnekler ilgili miRNA ifade profillerine göre istatistiksel olarak anlamlı kümelenebilirler (Mann-Whitney; $W = 78.5$, $p = 0.0037$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir.

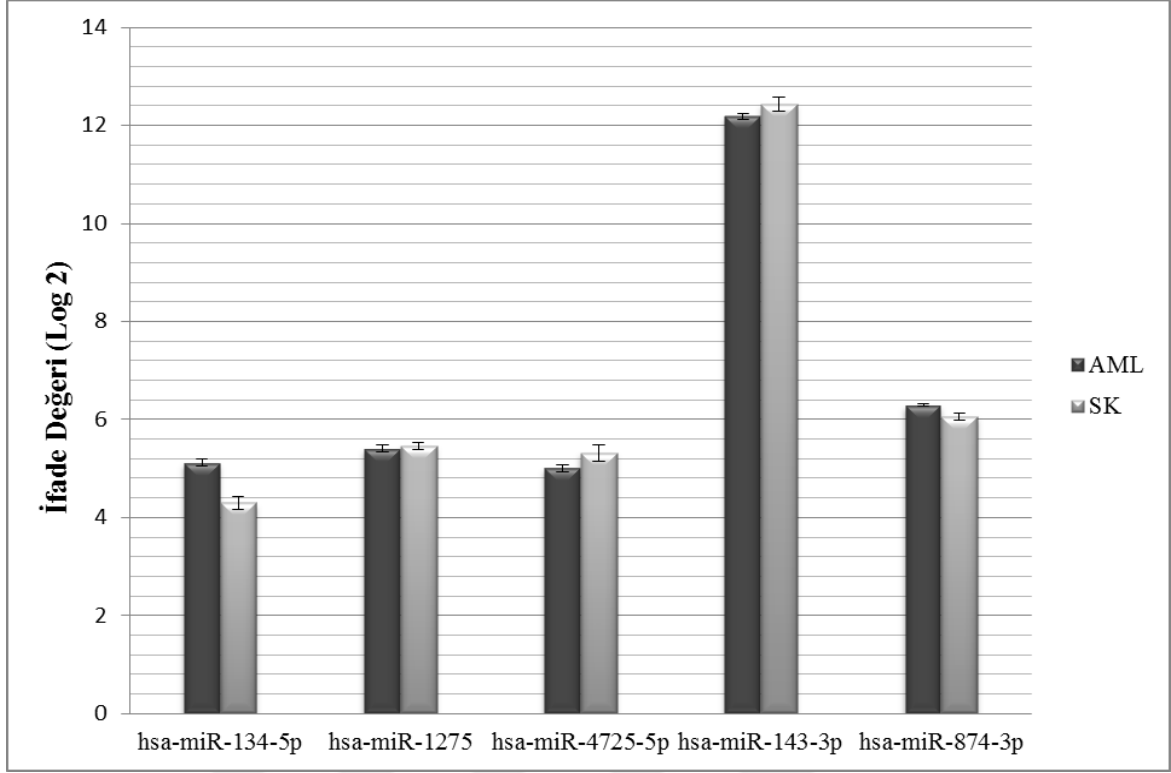


Şekil 5.14. Sınıf karşılaştırması sonucunda AML ve MDS arasında anlamlı değişiklik gösteren ($p < 0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait temsili heatmap. AML ve MDS örnekleri ilgili miRNA ifade profilleri istatistiksel olarak anlamlı kümelenmişlerdir (Mann-Whitney; $W=78.5$, $p=0.0037$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir.

5.4. MİRNA'LARIN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASINA AİT BULGULAR

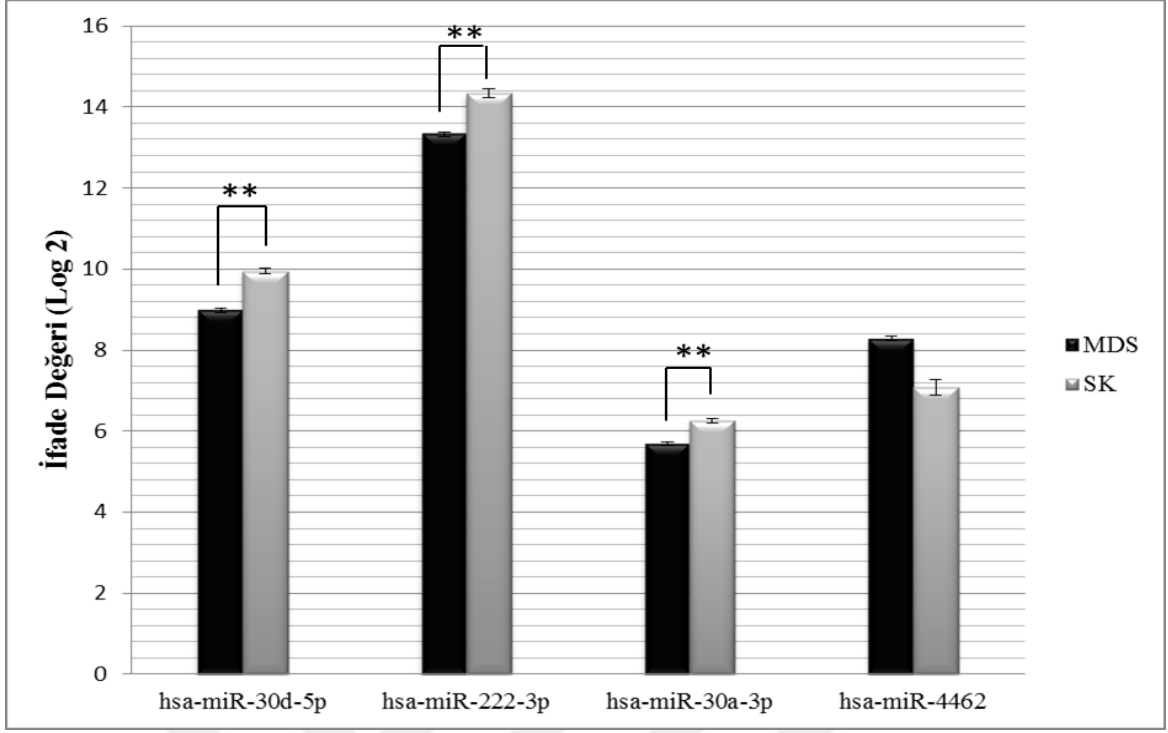
miRNA mikrodizin analizi sonucunda AML-Sağlıklı kontrol, MDS-Sağlıklı kontrol ve AML-MDS karşılaştırması sonucunda anlamlı olarak değişiklik gösteren miRNA'lar ile eş zamanlı PZR çalışması yapılmıştır.

Yapılan eş zamanlı PZR sonucunda da AML grubunda Sağlıklı kontrol grubuna göre hsa-miR-134-5p ve hsa-miR-874-3p'nin ifadesi artış gösterdiği, hsa-miR-1275, hsa-miR-4725-5p ve hsa-miR-143-3p'nin ifadesinin ise azalış gösterdiği doğrulanmıştır (Şekil 5.15).



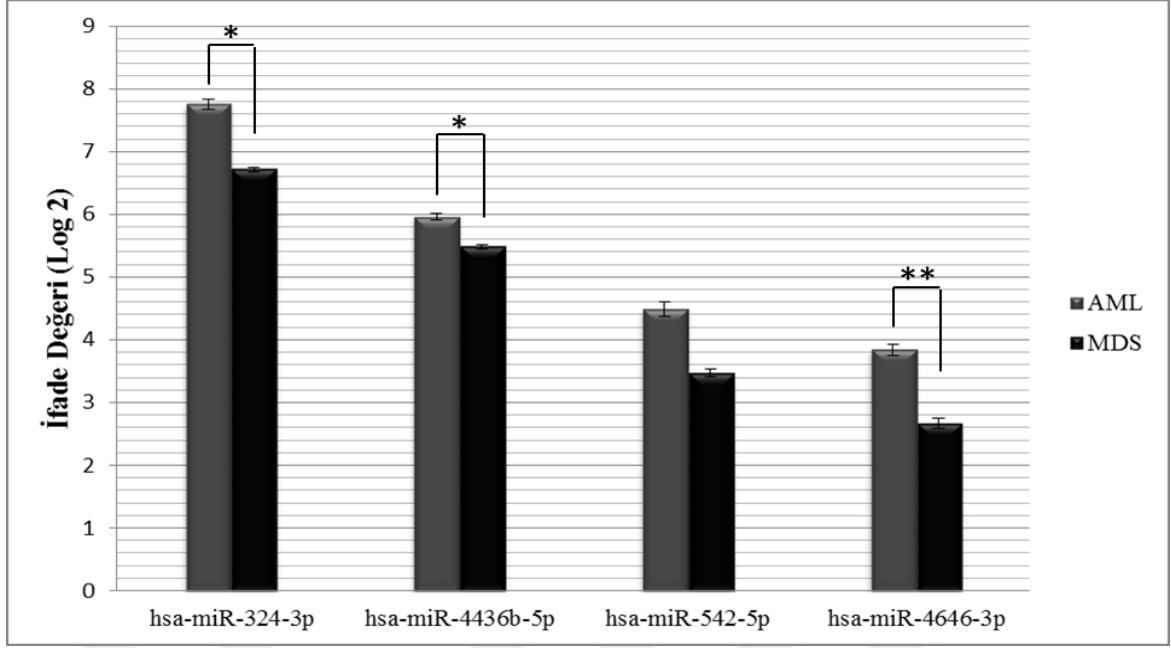
Şekil 5.15. AML ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=20).

Eş zamanlı PZR analizi sonucunda MDS grubunda Sağlıklı kontrol grubuna göre hsa-miR-4462'nin ifadesinin artış gösterdiği, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin ifadesinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalış gösterdiği doğrulanmıştır (Şekil 5.16; ** p<0.01, * p<0.05).



Şekil 5.16. MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=19; ** p<0.01, * p<0.05).

Eş zamanlı PZR analizi sonucunda AML grubunda MDS grubuna göre hsa-miR-542-5p'nin ifadesinin artış gösterdiği, hsa-miR-4646-3p, hsa-miR-324-3p ve hsa-miR-4436b-5p'nin ifadesinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği doğrulanmıştır (Şekil 5.17; ** p<0.01, * p<0.05).



Şekil 5.17. MDS ve AML hasta örnekleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=23; ** p<0.01, * p<0.05).

5.5. MİRNA HEDEF GENLERİNİN TESPİTİNE AİT BULGULAR

Sınıf karşılaştırması sonucunda iki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'lar ile hedef analizine gidilmiştir. miRNA'ların hedefleri biyoinformatik analizler ile tahmini olarak tespit edilmektedir. Her miRNA için tahmini hedefler miRWalk sitesinden indirilerek saklanmıştır. Çizelge 5.6'da çalışmada anlamlı olarak ifade değişimi gösteren her miRNA'nın tahmini hedef gen sayıları verilmiştir.

Çizelge 5.6. Tahmini miRNA hedef gen sayıları.

Gruplar	miRNA	Hedef Gen Sayısı
AML-SK	hsa-miR-134-5p	4153
MDS-SK	hsa-miR-30d-5p	5767
	hsa-miR-222-3p	5212
	hsa-miR-30a-3p	6984
AML-MDS	hsa-miR-324-3p	6774
	hsa-miR-4436b-5p	5951
	hsa-miR-4646-3p	4777

5.6. MİRNA HEDEF GENLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLMİŞ YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR

Mikrodizin ve eş-zamanlı PZR analizi sonucunda gruplar (AML-SK, MDS-SK, AML-MDS) arasında farklılık gösterdiği belirlenen miRNA'ların hedef genleri ile yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir miRNA için gerçekleştirilen yolak analiz sonuçları aşağıdaki tablolarda verilmiştir (tüm yolak tabloları, $p < 0.05$).

5.6.1. AML-SK YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR

Çizelge 5.7. AML'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi artan hsa-miR-134- 5p'ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Nörotropin sinyal yolağı	50	0.000603638
MAPK sinyal yolağı	88	0.00149612
İnsülin sinyal yolağı	51	0.002942104
Pankreas kanseri	31	0.009989168
Hipertropik kardiyomiyopati HCM	34	0.013071352
Fokal adezyon	66	0.015788473
Kalsiyum sinyal yolağı	59	0.01990696
Glioma	27	0.025968774
Kanser yolakları	97	0.033893818
Aritmogenik sağ ventriküler kardiyomiyopati ARVC	29	0.049555814

5.6.2. MDS-SK YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR

Çizelge 5.8. MDS'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi azalan hsa-miR-222-3p'ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Kanser yolakları	142	6.35E-09
İnsülin sinyal yolağı	68	1.96E-06
Wnt sinyal yolağı	72	4.04E-06
ErbB sinyal yolağı	48	5.85E-06
Akson yolağı	62	1.93E-05

Nörotropin sinyal yolağı	60	0.000124461
Kolorektal kanser	44	0.000149819
Prostat kanseri	45	0.000173345
Renal hücre karsinoma	38	0.00019391
MAPK sinyal yolağı	107	0.00033623
Glioma	35	0.00041786
Adheren bağlantılar	39	0.000552016
Pankreas kanseri	38	0.001083724
Kronik miyeloid lösemi (KML)	38	0.001083724
Adipositokin sinyal yolağı	36	0.001219249
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	29	0.003181911
T hücre reseptör sinyal yolağı	49	0.005083332
Fokal adezyon	79	0.010420254
Uzun süreli potansiyasyon	34	0.014024037
Küçük hücre akciğer kanseri	38	0.02479758
Melanoma	33	0.035004566
Endometrial kanser	26	0.037990042

Çizelge 5.9. MDS’li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi azalan hsa-miR-30a-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Kanser yolakları	164	1.02E-05
ErbB sinyal yolağı	54	0.000187237
Kronik miyeloid lösemi	47	0.000252484
Nörotropin sinyal yolağı	71	0.000704526
Prostat kanseri	52	0.001402508
Wnt sinyal yolağı	80	0.001738781
Glioma	40	0.002829178
İnsülin sinyal yolağı	72	0.009275016
Kolorektal kanser	48	0.015193236
Renal hücre karsinoma	41	0.017439801
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	33	0.018248975
Adheren bağlantılar	43	0.02250726
Kalsiyum sinyal yolağı	86	0.043263126

Çizelge 5.10. MDS’li hastalarda sağlıklı kontrollere göre ifadesi azalan hsa-miR-30d-5p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Kanser yolakları	149	8.86E-08
ErbB sinyal yolağı	51	5.65E-06
Glioma	39	4.43E-05
Wnt sinyal yolağı	74	5.76E-05
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	32	0.000758401
Kolorektal kanser	45	0.001044701
Kronik miyeloid lösemi	40	0.001857687
Pankreas kanseri	40	0.001857687
Akson yolağı	61	0.001911161
Adheren bağlantılar	39	0.007345033
Melanom	37	0.007434504

Ubiquitin ile sağlanan proteoliz	61	0.00776089
Nörotropin sinyal yolağı	59	0.008692302
Apoptoz	43	0.009688469
Melanogenez	48	0.017604951
Fosfatidilinositol sinyal sistemi	38	0.01859034
Prostat kanseri	43	0.01875791
Uzun süreli potansiyasyon	36	0.019390028
Endositoz	78	0.028909234
Fokal adezyon	83	0.039846496
Akut miyeloid lösemi	30	0.044278726

5.6.3. AML-MDS YOLAK ANALİZLERİNE AİT BULGULAR

Çizelge 5.11. AML’li hastalarda MDS’li hastalara göre ifadesi artan hsa-miR-324-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Akson yolağı	76	1.69E-06
Kanser yolakları	162	3.32E-06
MAPK sinyal yolağı	135	2.21E-05
Pankreas kanseri	47	9.08E-05
mTOR sinyal yolağı	35	0.000433501
Melanogenez	58	0.000445269
Wnt sinyal yolağı	80	0.000445635
Nörotropin sinyal yolağı	70	0.000447013
İnsülin sinyal yolağı	74	0.000599478
Kronik miyeloid lösemi	45	0.000836019
Kolorektal kanser	50	0.000901912
Glioma	40	0.001161649
ErbB sinyal yolağı	51	0.001294326
Adipositokin sinyal yolağı	42	0.001713158
Kalsiyum sinyal yolağı	88	0.003720883
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	33	0.008739587

Endositoz	90	0.010625604
Aldosteron ile düzenlenen sodyum reabsorbsiyon	27	0.011920672
Notch sinyal yolağı	29	0.01902668
Uzun süreli potansiyasyon	40	0.019417024
Akut miyeloid lösemi	34	0.021687215
Progesteron ile sağlanan oosit olgunlaşması	47	0.029593733
Fokal adezyon	94	0.041637139
VEGF sinyal yolağı	42	0.049075427

Çizelge 5.12. AML’li hastalarda MDS’li hastalara göre ifadesi artan hsa-miR-4436b-5p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Nörotropin sinyal yolağı	73	6.87E-08
Kanser yolakları	147	3.46E-06
ErbB sinyal yolağı	51	1.71E-05
Renal hücre karsinoma	42	6.89E-05
MAPK sinyal yolağı	120	0.000123763
Wnt sinyal yolağı	73	0.000469386
Ubiquitin ile sağlanan proteoliz	66	0.000469439
İnsülin sinyal yolağı	67	0.001012798
Akson yolağı	63	0.00111341
Glioma	37	0.001165634
Kolorektal kanser	45	0.002458872
Kalsiyum sinyal yolağı	80	0.003534307
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	31	0.004928858
Uzun süreli potansiyasyon	38	0.005716823
Prostat kanseri	45	0.007327636
T hücre reseptör sinyal yolağı	53	0.008820861
mTOR sinyal yolağı	30	0.00937356
Kronik miyeloid lösemi	39	0.010387324
VEGF sinyal yolağı	40	0.01261241

B hücre reseptör sinyal yolağı	38	0.025839321
Pankreas kanseri	38	0.025839321
Progesteron ile sağlanan oosit olgunlaşması	43	0.028508648
Adheren bağlantılar	38	0.036774223
Tip II diyabet	27	0.039345258
Fc epsilon RI sinyal yolağı	40	0.04926953

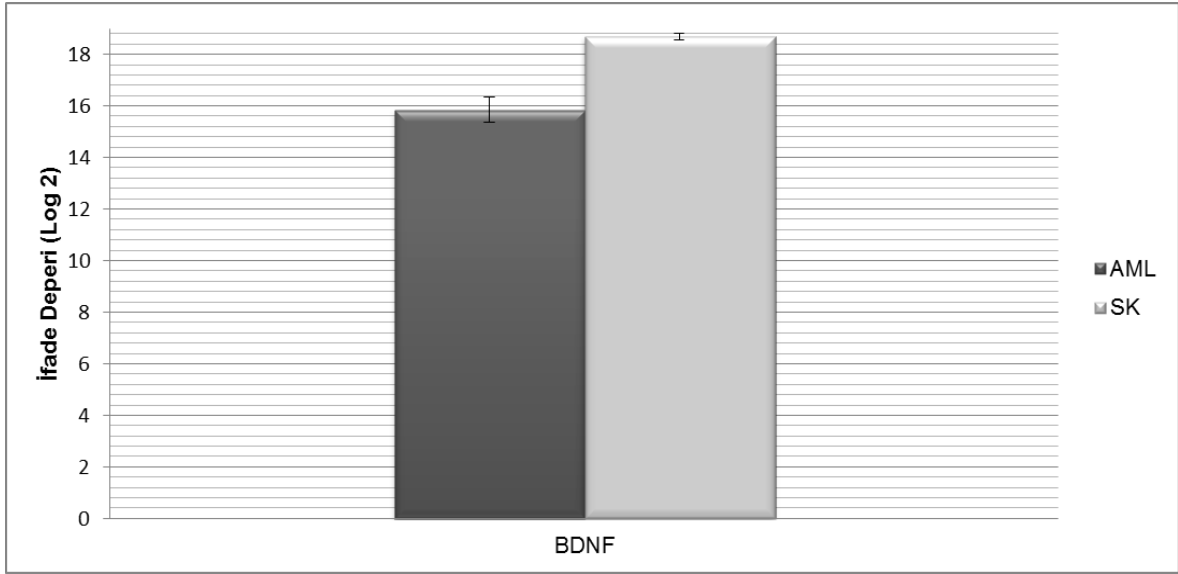
Çizelge 5.13. AML’li hastalarda MDS’li hastalara göre ifadesi artan hsa-miR-4646-3p’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p değeri
Wnt sinyal yolağı	65	6.57E-05
Kanser yolakları	119	0.000146992
Akson yolağı	55	0.00055924
Nörotropin sinyal yolağı	54	0.001308028
MAPK sinyal yolağı	98	0.001360754
Kalsiyum sinyal yolağı	69	0.001913522
İnsülin sinyal yolağı	56	0.003437506
Melanogenez	43	0.008694849
Apoptoz	38	0.009307231
Adipositokin sinyal yolağı	31	0.032177534
Uzun süreli potansiyasyon	31	0.043510553
Glioma	29	0.043517324

5.7. MİRNA HEDEF GENLERİNİN EŞ ZAMANLI PZR YÖNTEMİ İLE DOĞRULANMASINA AİT BULGULAR

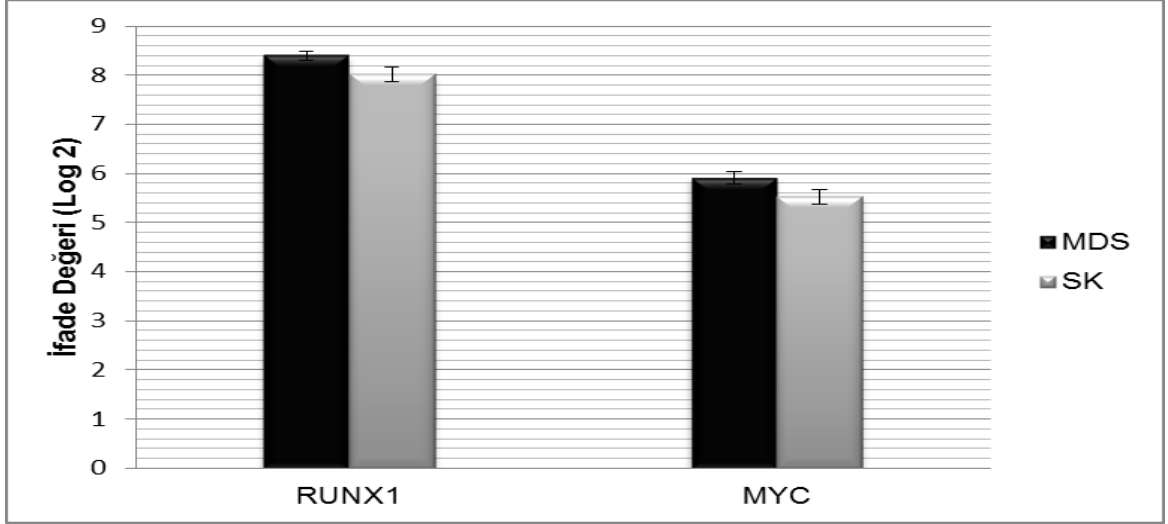
miRNA hedef genlerinin biyoinformatik olarak web tabanlı araçlar ile belirlenmesinin ardından seçilen bazı hedef genleri doğrulama çalışmaları eş zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. AML-Sağlıklı kontrol kıyaslamasında beklenen doğrultuda ifade gösteren miRNA olan hsa-miR-134-5p’nin ifadesinin AML örneklerinde arttığı bulunmuş ve bu artışın hedef genlerin ifadesinin azalmasına sebep olacağı düşünülmüştür. Hsa-miR-134-5p’nin hedefleri arasında yer alan BDNF geni ile gerçekleştiren eş-zamanlı PZR

çalışması sonucunda bu genin ifadesinin beklendiği üzere AML örneklerinde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.18).



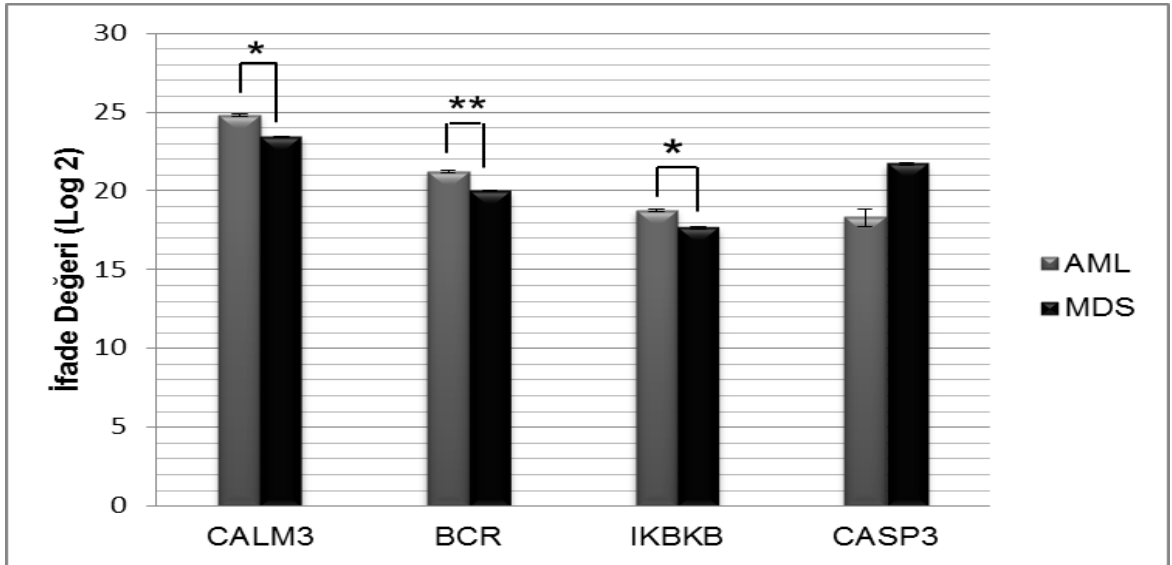
Şekil 5.18. AML ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen BDNF (hsa-miR-134-5p'nin hedefi) geninin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=21).

MDS-Sağlıklı kontrol kıyaslaması sonucunda farklılık gösteren miRNA'ların hepsinin ifadesinde azalma gözlenmiş (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-3p) ve bu azalmanın hedef genlere olan etkisinin artma şeklinde olacağı beklenmiştir. Hedefleri ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR çalışması sonuçları beklenen doğrultuda gözlenmiş olup RUNX-1 ve MYC genlerinin ifadelerinin MDS örneklerinde arttığı bulunmuştur (Şekil 5.19).



Şekil 5.19. MDS ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen RUNX1 (hsa-miR-30d-5p'nin hedefi) ve MYC (hsa-miR-30a-3p'nin hedefi) geninin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=16).

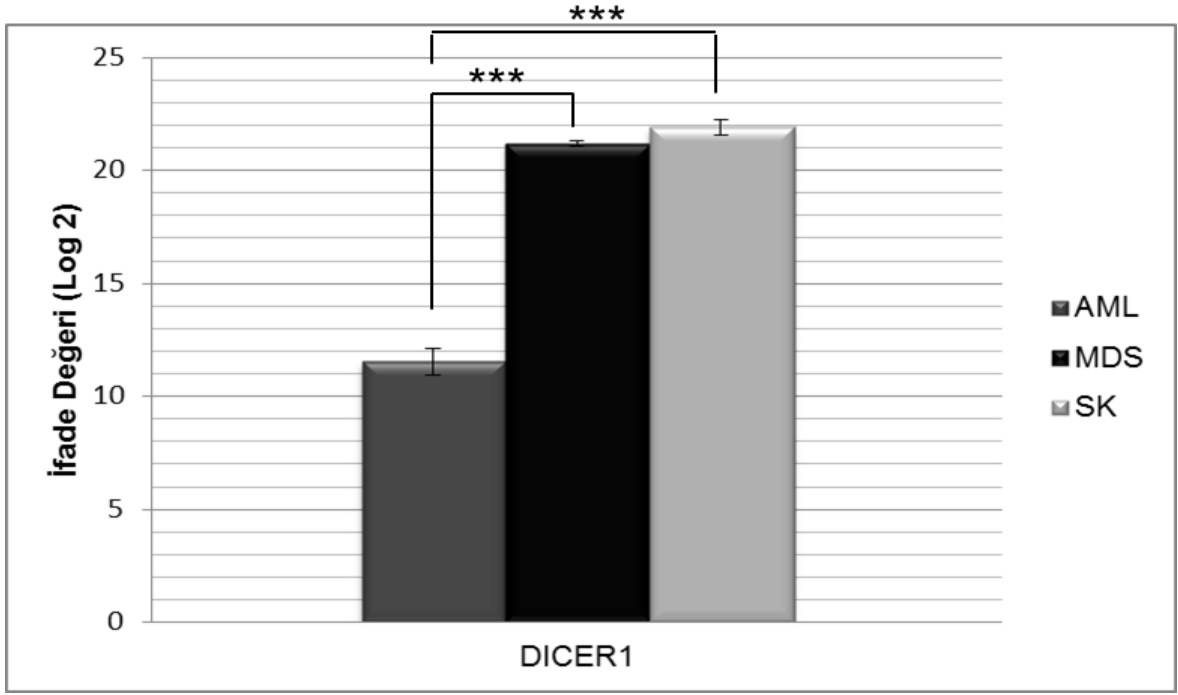
AML-MDS kıyaslaması sonucunda eş zamanlı PZR yöntemi ile analiz edilen hedef genlerden CASP3'ün ifadesinin hedefleyen miRNA ile beklenildiği gibi ters davrandığı tespit edilmiştir. Hedef genlerden 3 tanesinin (CALM3, BCR, IKBKB) ise beklenenden ters ifade değişimi göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.20).



Şekil 5.20. MDS ve AML örnekleri ile gerçekleştirilen CALM3 (hsa-miR-4646-3p'nin hedefi), BCR (hsa-miR-4436b-5p'nin hedefi), IKBKB (hsa-miR-324-3p'nin hedefi) ve CASP3 (hsa-miR-4436b-5p'nin hedefi) genlerinin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=21; * p<0.05, ** p<0.01.).

5.8. DICER1 GENİNİN İFADE ANALİZİNE AİT BULGULAR

DICER1 geninin ifadesi eş-zamanlı PZR yöntemi ile saptanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu MKH'lerindeki DICER1 gen ifadesinin MDS ve AML hastalarının MKH'lerindeki ifadesinden daha yüksek olduğu ve sağlıklı kontrol'den MDS'ye, MDS'den AML'ye gittikçe ifadenin anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 5.21).



Şekil 5.21. MDS/ AML ve sağlıklı kontrol örnekleri ile gerçekleştirilen DICER1 geninin eş zamanlı PZR ifade sonuçları ile çizilen sütun grafiği (n=29; p<0.001).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalarda miRNA'ların HKH'lerin farklılaşmasını düzenleyerek hematopoezde de önemli rol aldıkları gösterilmiştir (297-299). Çalışmamızın başlangıç noktasını oluşturan Raaijmakers'ın yaptığı araştırmada fare osteoprogenitörlerinde DICER1 delesyonu ile miRNA'ların global ifade azalmasının tümörigenezi tetiklediği belirtilerek mikroçevredeki miRNA'ların hastalık patogenezindeki rolü gösterilmiştir. MDS/AML gibi hastalıklarda hematopoezde bozulma görüldüğü ve osteoprogenitörlerdeki miRNA'ların ifade azalmasının hastalık başlamasını tetiklediği bilgilerinden yola çıkarak miRNA'ların hematopoetik mikroçevre üzerinde ve hematopoezde düzenleyici rolleri olabilir diye düşünülmüş, böylelikle MDS ve AML hastalarının MKH'lerinde sağlıklı kontrollere göre, DICER1 geni ifadesinin ve miRNA ifade profillerinin farklılık gösterebileceği ve bu farklılıkların hastalıkların oluşum ve gelişimin sürecini açıklayabileceği öngörülmüştür.

MDS/AML hastalıkları ile yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda hematopoetik hücrelere ait bozukluklar detaylı olarak incelenmiş olmakla birlikte stromal anormallikler ancak son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır. Kemik iliğinde hematopoetik hücreler ile stromanın yakın ilişkide olması nedeniyle hematopoetik bozuklukların stromal hücrelerde de değişikliğe yol açabileceği bilinmektedir. Buna rağmen stromaya ait primer bozuklukların MDS/AML gelişimine yol açtığını kanıtlayan çalışmalar yok denecek kadar azdır. Son bir yıl içinde yapılan hayvan deneyleri hastalık gelişiminde mikroçevrenin primer rolüne işaret etmektedir. Son yıllarda farelerde yapılan çalışmalarda hematopoetik hastalıkların başlangıcı ve desteklenmesinde kemik iliği mikroçevresinin aktif rol oynadığı rapor edilmiştir. Çalışmalar anormal mikroçevrenin hematopoetik hastalıkların başlangıcı ve ilerlemesinde aktif rol oynadıklarını göstermektedir (238,239,337,338).

Raaijmakers ve ekibinin yapmış olduğu çalışma MDS/AML gibi hematopoetik malignitelere kemik iliği mikroçevresinin önemini en güzel biçimde ortaya koymaktadır. Araştırma bulguları bireysel hücreler stromal elementlerin doku homeostazındaki rolünü göstermektedir ve bu hücrelerin başlıca fonksiyon bozukluğunun hematopoetik sistemde

sekonder neoplastik hastalığı başlatabileceğini açığa çıkarmıştır. Osteoprogenitör hücrelerde DICER1 delesyonu olgun miRNA'ların global ifade azalmasına yol açtığı için insanlardaki miRNA bozukluklarının MDS/AML'nin patogenezindeki rollerinin belirlenmesi önemli olacaktır.

Yapılan bu fare çalışmaları birlikte değerlendirildiğinde bu çalışmalar kemik iliği mikroçevresindeki başlıca değişikliklerin insan hastalığına benzer hematopoetik anormallikleri başlatmadaki kapasitesini ve önemini örneklendirmektedir. Üstelik bu araştırmalarda yapılan transplantasyon çalışmalarıyla hematopoetik hücrelerin normal fenotipine dönüşmesi mikroçevrenin bu hastalıklardaki rolünü kanıtlamaktadır. Bu çalışmalar mikroçevredeki değişikliklerin daha uygun ortam sağlayarak malin klonal hücrelerin büyümesini kolaylaştırdığını ve maligniteye giden çok adımlı süreçte mikroçevrenin başlıca rolünün olduğunu göstermektedir (19,238,239,337,338). Bütün bu deneyler fare modelleri üzerinde yapılmıştır, fakat insanlarda mikroçevrenin tam olarak hastalığa katkısı gösterilememiştir.

Günümüze kadar yapılan insan çalışmalarında MDS/AML kemik iliği kökenli MKH'lerde morfolojik, fonksiyonel ve kantitatif değişiklikler araştırılmıştır. Fakat MKH'lerin bazı hematolojik hastalıklarda düzeylerinin ve fonksiyonlarının değişip değişmediği ve böyle değişikliklerin hastalığın ilerlemesindeki katkısı hakkında çelişkili bilgiler bulunmaktadır. Yapılan bu araştırmaların bazılarında MKH'lerin farklı morfolojik, fonksiyonel, fenotipik, kalitatif ve kantitatif özellikler gösterdikleri tespit edilirken (248,258,276,339,340) diğer çalışmalarda MKH'lerin önemli morfolojik, fonksiyonel, fenotipik, kalitatif ve kantitatif anormallikler göstermedikleri tespit edilmiştir (244, 341, 342).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MDS MKH'lerinde sağlıklı kontrollere göre *in vitro* ortamda büyüme ve çoğalma kapasitelerinde azalma tespit edilmiştir. Geyh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada tüm MDS alttiplerindeki MKH'lerin (n:106) büyüme ve çoğalma kapasitelerinde önemli şekilde azalma tespit edilmiştir (343). Aanei ve arkadaşları tarafından yapılan iki çalışmada MDS-MKH'lerinin fokal adezyon protein anormallikleriyle ilişkili olan büyüme kusurları gösterdiği rapor edilmiştir (250,344). MDS MKH'lerindeki büyüme kusurlarının CD44 ve CD49e ($\alpha 5$ -integrin) moleküllerindeki azalmayla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Diğer çalışmalarda MDS-MKH'lerinde

çoğalma kapasitelerinde azalma tespit edilmiştir (276,341,345). Bizim çalışmamızda da belirtilen çalışmalara benzer şekilde özellikle MDS MKH'leri olmak üzere MDS ve AML örneklerinin çoğunluğunda MKH'lerin büyüme, çoğalma kapasitelerinde ve hücrelerin kültür kaplarını kaplama yüzdesinde azalma tespit edilmiştir. MDS/AML MKH'lerinin kültür çalışmalarında çoğu örnekte üreme sorunu gözlemlenmiştir. Genellikle hücreler ilk pasajdan sonra yaşlanmaya başlamış ve çoğalmamıştır. Bu nedenle örneklerin çoğunluğunu pasaj 3'e getirme zorluğuyla karşılaşmıştır. Az sayıda örnek pasaj 3'e getirilebilmiştir. Ayrıca hasta örneklerinin çoğunluğunda ilerleyen pasajlarda hücrelerde anormal hücre morfolojisi tespit edilmiştir. Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde MDS/AML MKH'lerinin büyüme ve çoğalma kapasitelerindeki azalmanın hematopoetik mikroçevrenin hematopoezi destekleme kapasitesinde bozulmaya yol açabilecek nedenlerden biri olabileceği ve böylelikle bu hastalıkların patogenezinde rolü olabileceği söylenebilir.

Yapılan çalışmalarda MDS MKH'lerinin farklılaşma kapasiteleri de analiz edilmiştir. Varga ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise MDS MKH'lerinde adipojenik farklılaşmada azalma tespit edilmiştir (345). Ferrer ve ark. tarafından yapılan çalışmada sağlıklı kontrollere göre MDS MKH'lerinde osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerinde azalma tespit edilmiştir (249). Geyh ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada MDS MKH'lerinin osteojenik farklılaşma kapasitesinin sağlıklı kontrollere göre azaldığı sitokimyasal boyama ve osterix ile osteokalsinin azalan ifadesiyle kanıtlanmıştır (343). Bizim çalışmamızda ise diğer çalışmalara benzer şekilde morfolojik ve kantitatif analiz sonuçları değerlendirildiğinde MDS/AML örneklerinde sağlıklı kontrollere göre osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerinde azalma tespit edilmiştir. Kantitatif ölçüm sonuçlarına göre farklılaşma analiz sonuçlarında dikkati çeken önemli bir nokta MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerinin sağlıklı kontrollerden MDS'ye ve MDS'den AML'ye doğru kademeli bir azalma göstermiş olmasıdır (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5). MDS/AML MKH'lerinin farklılaşma kapasitelerindeki azalmalar MDS ve AML'de nişin bozulabileceğinin bir göstergesi olabilir ve bu değişiklikler bu hastalıkların önemli özelliği olan yetersiz hematopoezin bir nedeni olabilir. Çünkü osteoblastlar ve adipositler nişin önemli bileşenleridir ve çeşitli sitokin ve sinyal molekülleri salgılayarak ve hücre-hücre iletişimiyle hematopoezi düzenlerler. Dolayısıyla

MDS ve AML MKH'lerindeki farklılaşma anormallikleri bu hastalıkların patolojisinde mikroçevresel etken olarak rol oynayabilir.

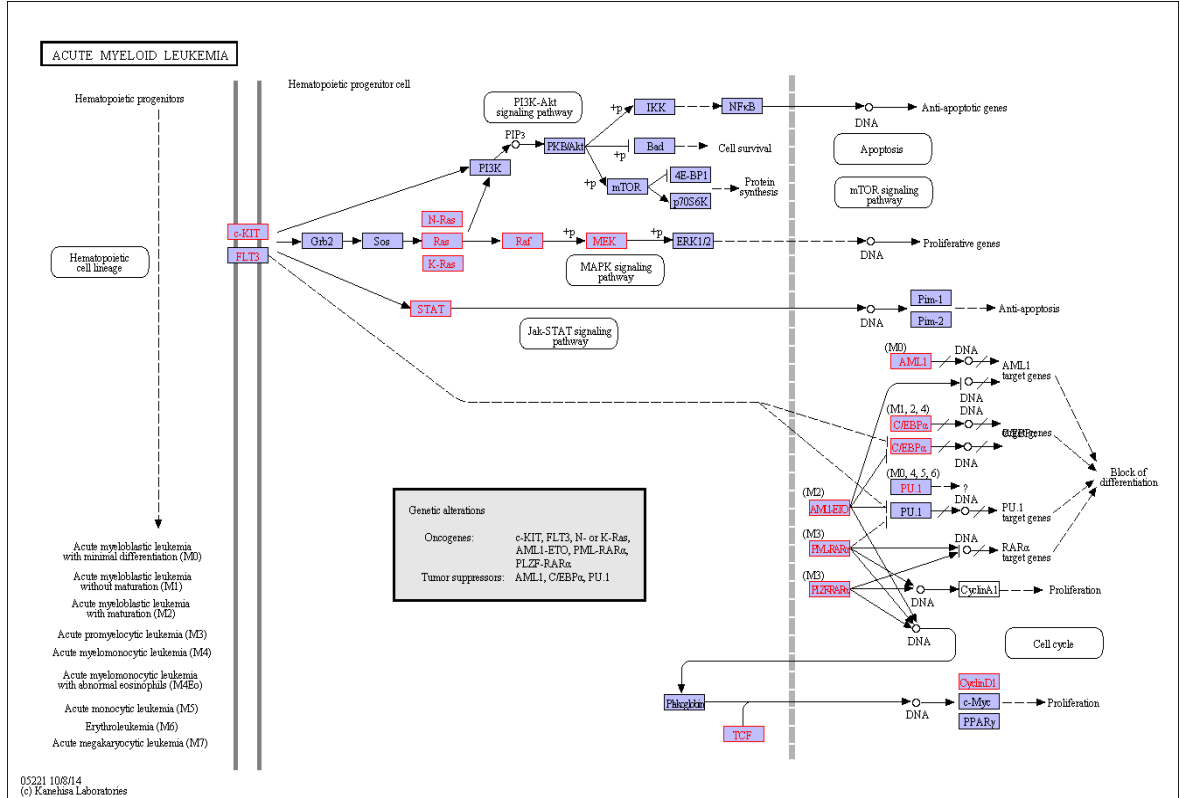
MDS/AML MKH'lerindeki kromozomal ve gen ifadesi değişiklikleri hakkında az sayıda çalışma vardır ve sadece son yıllarda çalışılmıştır. Birkaç çalışmada sitogenetik anormallikler bulunmamasına rağmen (346,347) diğer çalışmalarda sitogenetik anormallikler tespit edilmiştir (244,255,275,348) Yapılan diğer bir çalışmada ise pediatrik MDS veya MDS ile ilişkili akut miyeloid lösemi (MDS-AML) hastalarıyla sağlıklı kontrollerin kemik iliği stromal hücrelerinin karşılaştırmalı gen ifade analizi araştırılmıştır. Sağlıklı kontroller ve MDS'li veya MDS-AML pediatrik hastalarından elde edilen kemik iliği stromal hücreleri arasında gen ifadelerinde farklılıklar tespit edilmiştir (349). Yapılan bir başka çalışmada MDS MKH'lerinin genomik değişiklikler gösterdiği belirtilmiştir (276).

MDS/AML'de son yıllarda miRNA ifade profilleri rapor edilmektedir. Bu çalışmalarda hastalık sitogenetiği, diyognozu, prognozu ve patolojisiyle bağlantılı olabilecek miRNA imza profilleri tanımlanmıştır (317,318,324,326,327,350). MDS/AML'de ifadesi bozulan miRNA'ların tanımlanması bu miRNA'ların MDS/AML patolojisindeki rollerine işaret edebilir. İfadesi bozulan miRNA'ların çeşitli şekillerde hematopoetik hücrelerin kendini yenilemesinde artış, farklılaşmanın azalması, apoptozun değişmesi ve/veya lösemik hücrelerin anormal çoğalmasına katkıda bulunarak MDS/AML'de rolü olabilir.

MDS/AML'deki miRNA ifade çalışmaları kısıtlı olmasına ve çeşitli hücre tiplerinde yapılmasına rağmen bu çalışmalar miRNA'ların klinik biyobelirteç olarak yararlılıkları yanısıra MDS/AML patogenezinde miRNA'ların rolünü araştırmada önemli başlangıç noktası sergileyebilirler. Bizim çalışmamızda hastalar ve sağlıklı kontrollerde mikroçevrenin başlıca bileşeni olan MKH'lerde miRNA ifade profilleri yapılmış ve miRNA boyutunda moleküler değişiklikler gösterilmiştir. Ayrıca MDS ve AML'de sağlıklı kontrollere göre DICER1 gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir.

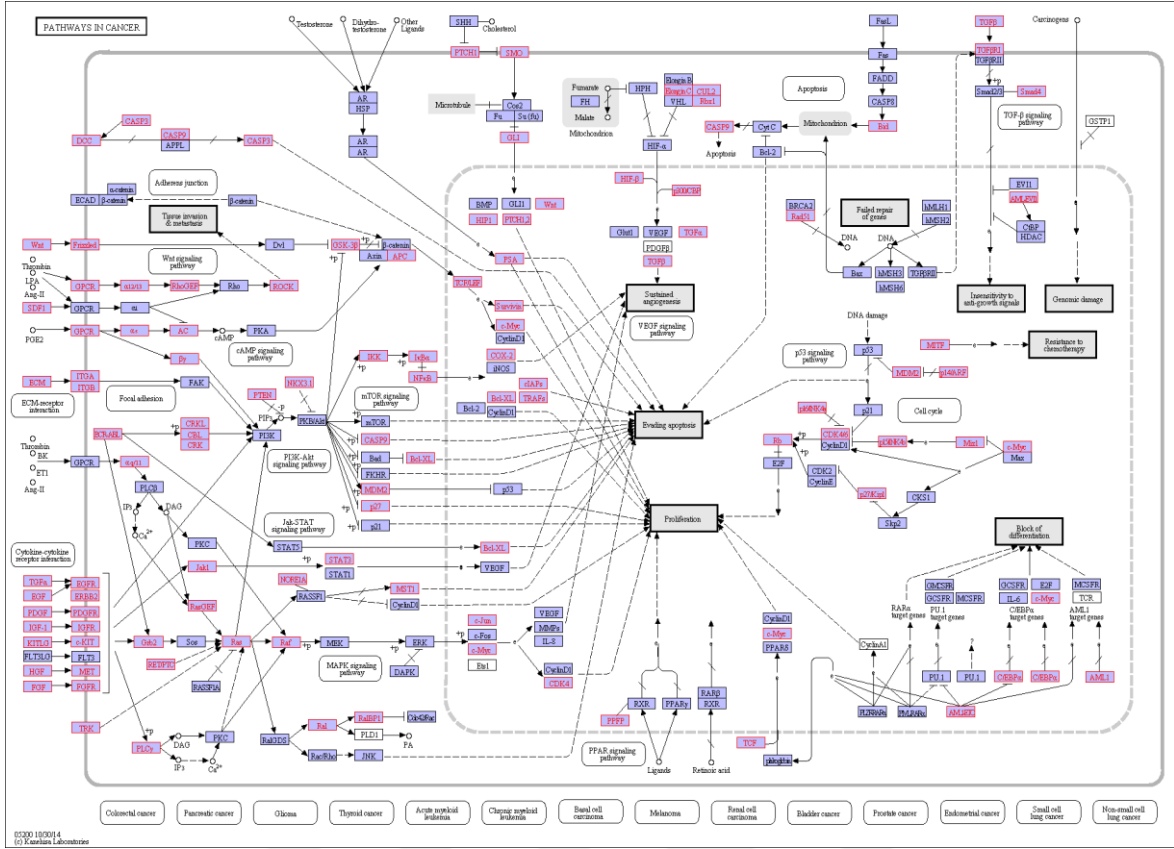
6.1.1. MDS MKH MİRNA PROFİLLERİNİN SK MKH MİRNA PROFİLLERİ İLE KİYASLANMASI

MDS hastalarından elde edilen MKH'ler ile gerçekleştirilen miRNA mikrodizin sonuçlarına göre 7 adet miRNA'nın (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-5581-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-6165, hsa-miR-4462, hsa-miR-1914-3p) MDS'li bireyleri sağlıklı kontrollerden ayırabildiği ve hsa-miR-4462 haricinde diğer bütün miRNA'ların ifadesinin MDS'de azaldığı bulunmuştur. Mikrodizin verilerini doğrulama çalışmaları altın standart metot olan eş-zamanlı PZR ile gerçekleştirilmiş ve bahsi geçen miRNA'lardan **hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin** MDS'li bireylerde sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında anlamlı olarak azaldığı ($p < 0.009$) doğrulanmıştır. miRNA'ların hedeflerinin 3'-UTR bölgelerine bağlanarak hedefledikleri genlerin işlevlerini düzenledikleri ve özellikle ifadeyi baskılayarak mRNA ya da protein düzeyinde ifadeyi azalttıkları bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak MDS ile sağlıklı kontrollerin kıyaslanmasında anlamlı olarak farklılık gösteren bütün miRNA'ların ifadesinin azaldığı düşünüldüğünde hedeflerinin ifadelerinde artış görülmesi beklenmektedir. Eş zamanlı PZR ile doğruluğu saptanmış miRNA'ların hedefleri ile gerçekleştirilen yolak analiz sonuçlarına göre hedef genler öncelikle anlamlı olarak AML ve KML gibi kanser yolaklarında zenginleşmiştir. KEGG'den elde edilen AML yolağı incelendiğinde, miRNA hedeflerinin arasında Ras, Raf ve MEK gibi hücre çoğalmasını tetikleyen proteinlerin olduğu dikkat çekmektedir. Bu proteinleri hedefleyen miRNA'ların ifadeleri azaldığı için miRNA hedeflerinin ifadelerinin artması ve dolayısı ile hücre çoğalmasının artması ve hücreleri kanserleşme sürecine götürmeleri beklenebilir (Şekil 6.1). Yine aynı yolak incelendiğinde miRNA'ların hedefleri arasında artan miktarda CEBPA olduğu ve bu proteinin varlığında hücre farklılaşmasının engellendiği ve kanserleşme sürecine katkıda bulunduğu gözlenmektedir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. AML sinyal yolağının KEGG görüntüsü. MDS-SK MKH'leri arasında anlamlı olarak farklılık gösteren 3 miRNA'nın (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p) hedeflerinin bazılarının yer aldığı AML sinyal yolağı görülmektedir. Pembe ile işaretli olan proteinler miRNA hedeflerini işaret etmektedir.

KEGG'den elde edilen kanser yolağı incelendiğinde, MDS-Sağlıklı kontrol MKH'leri arasında anlamlı olarak farklılık gösteren 3 miRNA'nın (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin) hedeflerinin arasında HKH'lerin düzenlenmesinde ve hematopozde rolü olan sitokinler, büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri tespit edilmiştir (SDF-1, Wnt, TGF α , EGF, PDGF, IGF-1, KITLG, HGF, FGF) (Şekil 6.2).

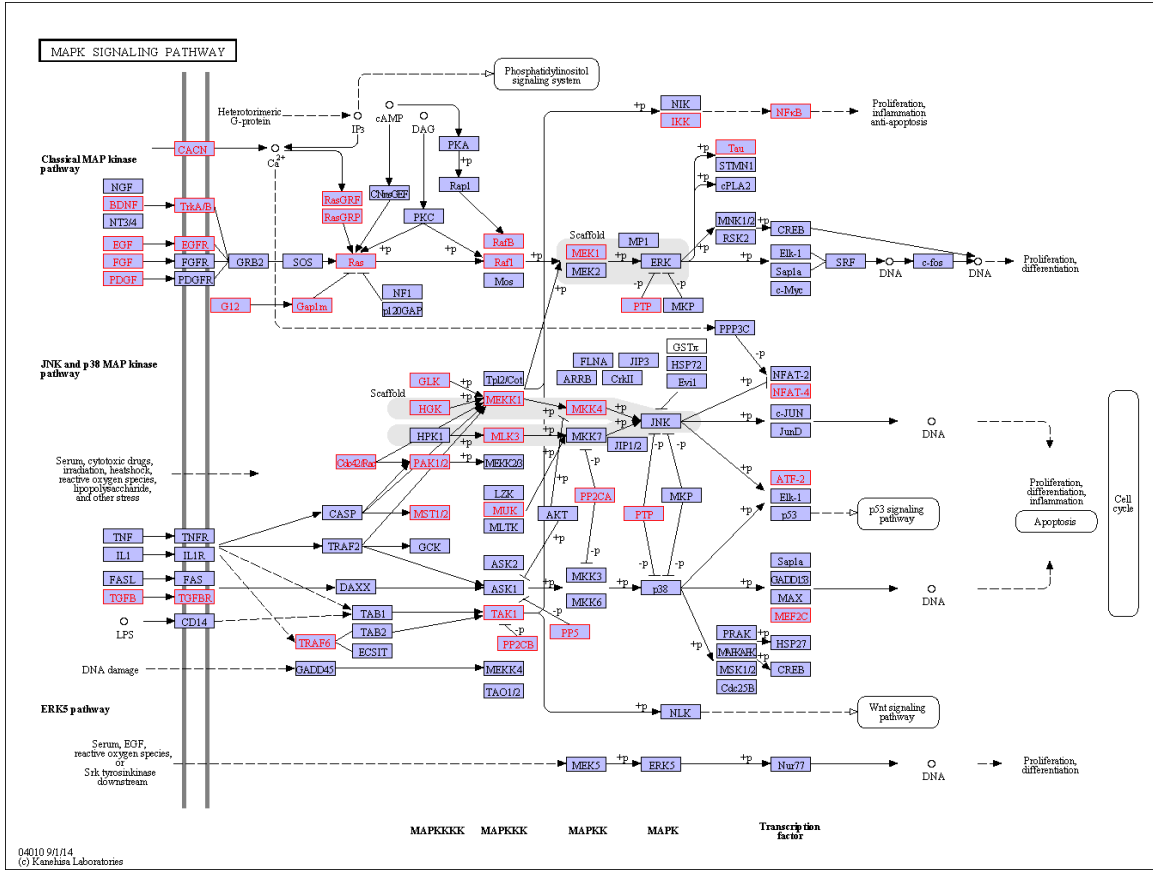


Şekil 6.2. Kanserde yer alan sinyal yollarının KEGG görüntüsü. MDS-SK MKH'leri arasında anlamlı olarak farklılık gösteren 3 miRNA'nın (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin) hedeflerinin bazılarının yer aldığı kanser sinyal yolları görülmektedir. Pembe ile işaretli olan proteinler miRNA hedeflerini işaret etmektedir.

6.1.2. AML MKH MİRNA PROFİLLERİNİN SK MKH MİRNA PROFİLLERİ İLE KIYASLANMASI

AML hastalarından elde edilen MKH'ler ile gerçekleştirilen miRNA mikrodizin sonuçlarına göre 9 adet miRNA'nın (hsa-miR-4485-3p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-1973, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-4646-3p, hsa-miR-1275, hsa-miR-4725-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-874-3p) AML'li bireyleri sağlıklı kontrollerden ayırabildiği ve sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında AML'de hem artan hem de azalan miRNA'ların olduğu gösterilmiştir. Eş zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirilen doğrulama çalışmaları sonucunda mikrodizin verisine en uyumlu olan miRNA'nın $p < 0,03$ değeri ve 2,05 kat değişim ile hsa-miR-134-5p olduğu dikkat çekmiştir. Bu miRNA'nın hedefleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri incelendiğinde HKH'ler üzerinde ve hematopoezde mikroçevresel olarak düzenleyici

rolleri olan hedef genlerin (BDNF, EGF, FGF, PDGF, TGF β) MAPK gibi kanserle ilişkili sinyal yollarında zenginleştiği tespit edilmiştir (Şekil 6.3).

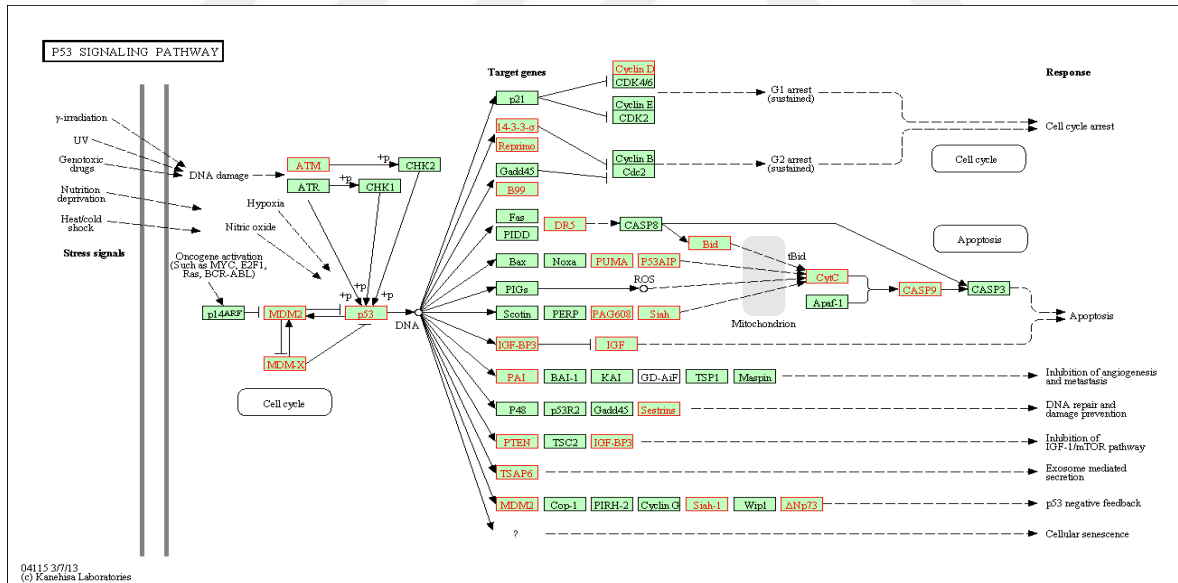


Şekil 6.3. MAPK sinyal yolağının KEGG görüntüsü. hsa-134-5p'nin hedeflediği genlerin bir kısmının yer aldığı MAPK sinyal yolağının KEGG'den elde edilmiş görüntüsü. Pembe ile işaretli olan proteinler miRNA hedeflerini işaret etmektedir.

6.1.3. MDS MKH MİRNA PROFİLLERİNİN AML MKH MİRNA PROFİLLERİ İLE KIYASLANMASI

AML ve MDS MKH'lerinden elde edilen miRNA profilleri kıyaslandığında 7 adet miRNA'nın anlamlı olarak farklılık gösterdiği bulunmuştur ve bütün miRNA'ların ifadelerinin AML'de MDS'ye göre artış gösterdiği gözlenmiştir. Mikrodizin verilerinin doğrulanmasına yönelik gerçekleştirilen eş-zamanlı PZR çalışmaları sonucunda farklılık gösteren 7 adet miRNA'nın (hsa-miR-4652-3p, hsa-miR-33b-3p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-4646-3p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-4436b-5p, hsa-miR-542-5p) 3 tanesi doğrulanmıştır (hsa-miR-324-3p, hsa-miR-4436b-5p, hsa-miR-4646-3p). Eş-zamanlı PZR ile doğrulanan miRNA'ların hedefleri belirlenmiş ve yolak zenginleştirme analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu miRNA'ların her birinin AML'de artış gösterdiği göz önüne alındığında hedeflerinde ifade azalışı beklenmektedir. Yolak analizleri sonucunda hedef genlerin genellikle anlamlı olarak AML, KML ve p53 sinyal yollarında zenginleştiği dikkat çekmiştir. Yollar detaylı olarak incelendiğinde hedef genler arasında hücrede kontrol noktası proteini olarak görev yapan ATM ve tümör baskılayıcı gen olan p53'ün varlığı dikkat çekmiştir. Ayrıca hücrede apoptozu başlatan proteinler olan CASP9 ve CASP3 genleri de miRNA'ların direkt hedefleri arasında yer almaktadır. MDS-AML geçişinde miRNA seviyesindeki artışın, hedeflediği genlerin ifadelerinde azalışa sebep olacağı düşünüldüğünde hücrede DNA tamir mekanizmasını uyaran ATM'nin ifadesindeki azalma ya da bozulma p53'ün de azalması ile birlikte hücreyi kansere sürükleyecek yollardan biri olabilir. Ayrıca hücrelerin kanserden kurtuluş mekanizması olarak kullandığı apoptoz proteinlerinin de miRNA'lar tarafından hedefleniyor olması bu proteinlerin seviyesindeki azalışa ve hücrenin apoptozdan kaçışına sebep olabilir. Dolayısı ile AML'de MDS'ye göre artış gösteren miRNA'ların hedeflediği genler ve bu genlerin görev aldığı yollar incelendiğinde bu miRNA'ların MDS-AML geçişinde önemli role sahip olabilecekleri düşünülebilir (Şekil 6.4).



Şekil 6.4. p53 sinyal yolağının KEGG görüntüsü. hsa-miR-4646-3p'nin hedeflediği genlerin bir kısmının yer aldığı p53 sinyal yolağının KEGG'den elde edilmiş görüntüsü. Pembe ile işaretli olan proteinler miRNA hedeflerini işaret etmektedir.

Çalışmamızda MDS-Sağlıklı kontrol ve AML-Sağlıklı kontrol arasında ifadesinde farklılık gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Fakat bu miRNA'lar MDS-AML karşılaştırmasında

ifadesinde farklılık gösteren miRNA'lar ile örtüşmemektedir. Bu sonucun gruplar arası farklılıklardan ve bireye özgü farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

miRNA biyogenezinde önemli rol oynayan bir RNaz III endonükleaz olan DICER1, omurgalı gelişiminde önemli rol oynamaktadır. DICER1 geni delesyona uğratılmış fare, zayıflamış kan damarı ve yol kesesi oluşumu göstererek 12,5. ve 14,5. embriyonik günleri arasındaki embriyonik gelişimde ölmüştür (351). Zebra balığının DICER1 mutant embriyoları gastrulasyon, beyin oluşumu, somitogenez ve kalp gelişimi boyunca anormal morfogenez göstermiştir (352). DICER1'in gelişim yanısıra kök hücrelerin bazı hücresel süreçlerinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. DICER1 ve DROSHA'nın *knock-out*'ının global miRNA ifade profili bozulmasına yol açarak kök hücrelerin hücre büyümesi, hücre bölünmesi, plastisite, kendini kopyalama, farklılaşma gibi hücresel mekanizmaları değiştirdiği rapor edilmiştir (353). Önceki çalışmalarda DICER1 ve DROSHA'nın *knock-out*'u kanser hücrelerinin tümörigenitesinde artışın yanısıra kanser hücre hatlarının hızlı çoğalmasına yolaçmıştır (354,355). DICER1 geni *knock-out* edilen farelerde aynı zamanda bir akciğer kanser modelinde tümör gelişiminin daha olası olduğu belirtilmiştir (354). Klinik çalışmalarda DICER1'in azalan ifadesi akciğer kanserinde kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (356). Diğer bir çalışmada DICER1 ve DROSHA'nın *knock-out*'ıyla global miRNA ifade bozulumu insan MKH'lerinin farklılaşma potansiyelini önemli ölçüde azaltmıştır (353).

Raaijmakers ve ark. yaptığı çalışmada fare osteoprogenitörlerindeki DICER-1 delesyonuyla miRNA'ların global ifade azalmasının tümörigenezi artırdığı rapor edilmiştir (19). Benzer bir başka çalışmada Santamaria ve ark. (241) 33 MDS ve 25 sağlıklı kontrol kemik iliği MKH'lerinde DICER-1, DROSHA ve SBDS genlerinin ifadesini araştırmıştır ve MDS'de DICER-1, DROSHA ve SBDS genlerinin ifadesinde sağlıklı kontrollere göre azalma tespit etmiştir. Bunun dışında bazı miRNA'ların (mir-155, miR-181a ve miR-222) ifadesinde de azalma tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada DICER1 ifadesi MDS/AML ve sağlıklı kontrollerde analiz edilmiş ve DICER1 ifadesi sağlıklı kontrollere göre MDS'den AML'ye doğru azalış göstermiştir (343). Bizim çalışmamızda MDS/AML hastalarından ve sağlıklı kontrollerden kemik iliğinin mikroçevresini oluşturan MKH'ler izole edilmiş, MDS ve AML gelişiminde kemik iliği mikroçevresinin önemi miRNA boyutunda

aydınlatılmaya çalışılmıştır. Ayrıca miRNA biyogenezinde çok önemli rolü olan DICER1 geninin osteoprogenitör hücrelerdeki delesyonunun hematolojik kanserlere yol açtığı göz önünde bulundurularak osteoprogenitör öncüsü olan MKH'lerdeki DICER1 ifadesi eş-zamanlı PZR yöntemi ile saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da Raaijmakers, Santamaria ve Geyh'in çalışmalarıyla uyumlu olarak DICER1 gen ifadesinin sağlıklı kontrollere göre MDS'den AML'ye doğru gittikçe anlamlı şekilde kademeli olarak azaldığı gösterilmiştir (Şekil 5.21). miRNA biyogenezinde çok önemli role sahip olan DICER1 geninin ifadesindeki dereceli azalış, bu genin ve bazı miRNA'ların ifade değişikliklerinin MDS/AML oluşumunda ve gelişiminde önemli rolleri olabileceğini doğrular niteliktedir. Yapılan bir çalışmada DICER1 ve DROSHA'nın *knock-out*'ünün insan MKH'lerinin farklılaşma potansiyelini önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (353). Bizim çalışmamızda da DICER1 genindeki ifadenin MDS'den AML'ye gittikçe anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. DICER1 genindeki bu kademeli azalmaya paralel olarak aynı zamanda MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitelerinin de MDS'den AML'ye doğru azalması (Şekil 5.4 ve Şekil 5.5) DICER1 geninin insan MKH'lerinin farklılaşmasında düzenleyici rollerinin olabileceğini göstermektedir. DICER1 geninin insan MKH'lerinin farklılaşması üzerindeki rollerinin netleşmesi için daha çok çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde DICER1 geninin omurgalılarda embriyonik gelişim yanısıra kök hücrelerin hücre büyümesi, hücre bölünmesi, plastisite, kendini kopyalama, farklılaşma gibi geniş bir aralıktaki hücresel süreçlerde önemli rol oynadığı görülmektedir. DICER1 miRNA biyogenezinde rol oynadığı için geniş bir gen grubunun düzenlenmesinde önemli rolü olduğu söylenebilir. miRNA biyogenezinde önemli rolü olan bu enzimin çok çeşitli biyolojik süreçlerde rol alması dolayısıyla normalden daha karmaşık olması olasıdır. Yukarıda da belirtildiği gibi DICER1 *knock-out*'ünün ve ifadesinin bozulması çeşitli kanser tiplerinde tümörigenezi artırmıştır. Dolayısıyla DICER1 geninin fonksiyonunun bozulmasının akciğer kanserinde olduğu gibi MDS/AML gibi hematolojik kanserlerin patolojisinde de rolü olabilir.

Raaijmakers'ın yaptığı araştırmada fare osteoprogenitörlerinde DICER1 delesyonuyla miRNA'ların global ifade azalmasının tümörigenezi başlattığı belirtilerek mikroçevredeki

miRNA'ların hastalık patogenezindeki rolü gösterilmiştir. Diğer taraftan MDS/AML gibi hastalıklarda hematopoezde bozulma görüldüğünden ve miRNA'ların ifadelerindeki azalma hastalık başlamasını tetiklediğinden miRNA'ların hematopoetik mikroçevre üzerinde ve hematopoezde düzenleyici rolleri olabilir. Günümüze kadar miRNA'ların hematopoetik niş üzerindeki düzenleyici rolleri üzerinde yapılmış olan herhangi bir insan çalışması yok denecek kadar azdır ve hangi miRNA'nın bu düzenleyici rolü üstlendiği net değildir. Fakat son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda HKH'ler üzerinde düzenleyici rolü olan bazı miRNA'lar belirlenmiştir (312-315). Bu çalışmalar miRNA'ların hematopoezde mikroçevresel düzenleyici olarak rollerinin olabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda kanser yolaklarıyla ilişkili olan miRNA'lar tanımlanmıştır. Bu miRNA'lar MDS/AML'de mutasyona uğrayan önemli genler yanısıra hematopoetik mikroçevrede önemli düzenleyici rolleri olan sitokin, adezyon, büyüme faktörleri ve bazı sinyal genlerini hedeflemektedir.

Santamaria'nın yaptığı çalışmada DICER1, DROSHA, SBDS yanısıra mir-155, miR-181a ve miR-222 gibi miRNA'ların ifadesinde de azalma tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların SDF-1, TP53, PTEN ve MYC genlerini hedeflediği tespit edilmiş ve bu genlerden SDF-1 ifadesinin azaldığı belirtilmiştir (241). Benzer bir çalışmada 38 AML ve 24 sağlıklı kontrollerin kemik iliği kökenli MKH'lerinin miRNA ifade profilleri nanostring metoduyla analiz edilmiş ve farklılık gösteren miRNA'lar eş zamanlı PZR metodu ile doğrulanmıştır. Doğrulanmış miRNA'lardan let-7g, let-7c, miR-21, miR-93 ifadesinin AML'de sağlıklı kontrollere göre azaldığı, miR-410 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ifadesi değişen miRNA'ların hedef genlerinin lösemi yolaklarında zenginleştiği belirtilmiştir (357). Bizim çalışmamızda her bir hasta grubu ve sağlıklı kontroller ile gerçekleştirilmiş olan miRNA mikrodizin çalışmaları sonucunda MDS MKH'lerinin ve AML MKH'lerinin miRNA profilleri sağlıklı kontrol MKH'lerinin miRNA profilleri ile ve MDS MKH miRNA profilleri AML MKH miRNA profilleri ile kıyaslanmış ve MDS/AML spesifik miRNA'lar tespit edilmiştir. MDS örneklerinde 3 miRNA'nın (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin) ve AML örneklerinde bir miRNA'nın (hsa-miR-134-5p) anlamlı olarak ifadesinde farklılıklar tespit edilmiştir. miRNA hedef genlerinin biyoinformatik araçlar ile belirlenmesinin ardından seçilen bazı hedef genlerin doğrulama çalışmaları eş-zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

MDS-Sağlıklı kontrol kıyaslaması sonucunda farklılık gösteren miRNA'ların hepsinin ifadesinde azalma gözlenmiş (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p, hsa-miR-30a-3p) ve bu azalmanın hedef genlerin ifadesine olan etkisinin artma şeklinde olacağı beklenmiştir. Hedefleri ile gerçekleştirilen eş-zamanlı PZR çalışması sonuçları beklenen doğrultuda gözlenmiş olup RUNX-1 ve MYC genlerinin ifadelerinin MDS örneklerinde arttığı tespit edilmiştir (Şekil 5.19). AML-Sağlıklı kontrol MKH'leri kıyaslamasında beklenen doğrultuda ifade gösteren miRNA olan hsa-miR-134-5p'nin ifadesinin AML örneklerinde arttığı tespit edilmiş ve bu artışın hedef genlerin ifadesinin azalmasına sebep olacağı düşünülmüştür. Hsa-miR-134-5p'nin hedefleri arasında yer alan BDNF geni ile gerçekleştirilen eş-zamanlı PZR çalışması sonucunda bu genin ifadesinin beklendiği üzere AML örneklerinde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 5.18). MDS ve AML'de sıklıkla mutasyona uğrayan (RUNX-1 ve MYC), hücre çoğalmasında ve farklılaşmasında ve nişte düzenleyici rolleri olan RUNX-1, MYC ve BDNF genlerinin ifadelerinin MDS/AML'de değişmesi bu genlerin MDS/AML patogenezinde rollerinin olabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamız ve yapılan benzer çalışmalarda ifadesinde farklılık tespit edilen miRNA'lar birbiriyle örtüşmemektedir. Bunun nedeni ise çalışmalarda uygulanan metodun farklılık göstermesi, hastalık alttipinin farklı olması, hastaların sitogenetik ve moleküler açıdan farklılık göstermesi olabilir. Buna rağmen bu çalışmalarda ifadelerinde değişiklik gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir. Bu aday miRNA'ların MDS/AML gelişimi ve ilerlemesinde önemli rolleri olabilir. MDS/AML gelişimi ve ilerlemesinde mikroçevresel etken olarak rolü olan aday miRNA'ların fonksiyonunu kesin olarak belirlemek için fonksiyonel çalışmaların yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda bu miRNA'ların hedef genlerinin tespitinin de yapılması MDS/AML patogenezindeki miRNA'ların rollerinin anlaşılması açısından önemlidir.

Yolak zenginleştirme analizlerinde dikkat çeken bir diğer durum ise miRNA hedeflerinin özellikle kanser yolaklarında artış göstermesi olmuştur. Bu yolaklar incelendiğinde HKH'lerin düzenlenmesinde ve hematopoezde rolü olan sitokinler, büyüme faktörleri ve sinyal molekülleri tespit edilmiştir (SDF-1, Wnt, TGF α , EGF, PDGF, IGF-1, KITLG, HGF, FGF) (Şekil 6.2). Kemokinler ve reseptörleri HKH davranışını kontrol eder. En iyi bilinen kemokin olan SDF-1 aynı zamanda CXCL12 olarak adlandırılır. SDF-1 reseptörü CXCR4'dür ve HKH'ler ve progenitörlerinde ifade edilir (358). SDF-1 α -kemokinlere

aittir ve hem yönlendirilmiş hem de primitif hematopoetik progenitörler için kemoatraktan olarak görev yapar ve organ hemostazı gibi embriyonik gelişimi düzenler (359). CXCL12, HKH'lerin kemik iliğindeki nişine dönüşü de dahil olmak üzere bazı doku sistemlerindeki hücrelerin göçünde kritik rolü olduğu bilinen bir kemokindir. HKH'lerin bir kısmı kemik iliğindeki SDF-1 düzeyindeki değişimlere karşılık olarak nişten ayrılır, dolaşıma katılır ve nişe geri döner. HKH'lerin vasküler nişe toplanma süreci SDF-1'e bağlıdır. MDS MKH'lerinde hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin ifadelerinde anlamlı azalma tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu miRNA'ların hedeflerinden birisi olan SDF-1'in gen ifadesinin artması beklenmektedir. Bu miRNA'ların SDF-1'i hedefleyerek ve ifadesinde artışa yolaçarak mikroçevresel olarak HKH'lerin düzenlenmesinde bozulma nedeniyle, yani bir anlamda hematopoetik mikroçevrenin bozulması nedeniyle yetersiz hematopoeze yol açarak MDS'de rollerinin olabileceği söylenebilir. Ayrıca SDF-1 artışı malin MDS hücrelerinin nişe yerleşerek ve burada sessiz aşamada kalarak kendini yenilemesine, çoğalmasına ve sağkalımına katkıda bulunarak MDS'nin gelişimine olanak sağlayabilir. Yapılan diğer bir çalışma bulgumuzu destekler niteliktedir. Daha önce yapılan bir araştırmada MDS hastalarının kemik iliği MKH'lerinde SDF-1 gen ifadesi sağlıklı kontrollere göre oldukça yüksek bulunmuştur (360). Ancak Santamaria'nın çalışmasında MDS MKH'lerinde sağlıklılara göre ifadesi azalan miR-155 ve miR-181a'nın hedefleri arasında bulunan SDF-1 geninin ifadesinde azalma tespit edilmiştir (241).

Wnt sinyalinin HKH'lerin kendini yenilemesini düzenlediği gösterilmiştir. Wnt sinyali kemik oluşumu ve endosteal yüzeylerin gelişmesi için de önemlidir. Bazı kanıtlar endosteal stromal hücrelerindeki Wnt sinyalinin HKH devamlılığının sürdürülmesini olumsuz etkileyebileceğini belirtmiştir. Fakat stromal hücrelerdeki Wnt sinyalindeki değişikliklerin mikroçevresel mekanizmalarla HKH devamlılığını olumsuz etkilediğini gösteren veri bulunmaktadır (361). Bizim çalışmamızda da ifadesi azalan miRNA'ların (hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-222-3p ve hsa-miR-30a-3p'nin) hedefleri arasında bulunan Wnt sinyalinin ifadesinde artış beklenmesi mantıklıdır. Wnt sinyal değişiklikleri de HKH kendini yenilemesini etkileyerek ve farklılaşmasının engellenmesine yol açarak MDS patolojisinde rol oynayabilir. İfadeleri azalan bu miRNA'ların diğer hedefleri arasında EGF, PDGF, IGF-1, TGF α , HGF ve FGF gibi büyüme faktörleri bulunmaktadır. Bu büyüme faktörlerinin ifadesinde de artma beklenilmektedir. Büyüme faktörlerindeki artış

MDS'de anjiyogeneze yol açan nedenler arasında olabilir ve böylelikle MDS patolojisinde rol oynayabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda MDS hastalarının kemik iliği plazmalarında VEGF, bFGF, anjiyogenin, HGF, EGF ve TGF-beta gibi anjiyogenik faktörlerin değişen düzeyleri belirtilmiştir. Bu bulgular MDS'de ilk kan damarlarının gelişimini desteklemektedir (362-364).

AML hastalarından elde edilen MKH'ler ile gerçekleştirilen miRNA mikrodizin sonuçlarına göre 9 adet miRNA'nın (hsa-miR-4485-3p, hsa-miR-150-3p, hsa-miR-1973, hsa-miR-134-5p, hsa-miR-4646-3p, hsa-miR-1275, hsa-miR-4725-5p, hsa-miR-143-3p, hsa-miR-874-3p) AML'li bireyleri sağlıklı kontrollerden ayırabildiği ve sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında hem artan hem de azalan miRNA'ların olduğu gösterilmiştir. Eş zamanlı PZR yöntemi ile gerçekleştirilen doğrulama çalışmaları sonucunda mikrodizin verisine en uyumlu olan miRNA'nın $p < 0.03$ değeri ve 2.05 kat değişim ile hsa-miR-134-5p olduğu dikkat çekmiştir. Bu miRNA'nın hedefleri ile gerçekleştirilen yolak analizleri incelendiğinde HKH'ler üzerinde mikroçevresel olarak düzenleyici rolleri olan genleri (BDNF, EGF, FGF, PDGF, TGF β) hedeflediği ve bu genlerin MAPK gibi kanserde rolü olan sinyal yolağında zenginleştiği tespit edilmiştir (Şekil 6.3). Böylelikle bu miRNA'nın mikroçevre ile ilgili önemli genleri hedefleyerek ve ifadelerinde azalmaya yol açarak AML'de rolünün olabileceği söylenebilir. miRNA seviyesindeki değişim artış yönünde olduğu için hedeflediği genlerin ifadelerinde azalış beklenmektedir. Beklendiği gibi AML MKH'lerinde BDNF gen ifadesi sağlıklı kontrollere göre azalmıştır (Şekil 5.18). TGF β çoğalma, farklılaşma, göç ve hücre sağkalımı gibi hücresel süreçlerin önemli bir düzenleyicisidir. Hematopoez süresince TGF β hematopoetik progenitörlerde farklılaşma ve apoptozu artırırken çoğalmanın negatif düzenleyicisidir. hsa-miR-134-5p'nin ifadesindeki artış bu miRNA'nın hedefleri arasında yer alan TGF β 'nin ifadesinde azalmaya yolaçacaktır. Bu genin ifadesinde azalma ise hematopoetik progenitörlerin/HKH'lerin farklılaşmasını azaltabilir ve aynı zamanda bu hücrelerin apoptozdan kurtulmasına ve kanserleşmesine yol açarak AML patolojisinde önemli rolü olabilir. Diğer büyüme faktörleri olan EGF, FGF ve PDGF'in hematopoezin düzenlenmesinde rolü vardır ve bu genlerin ifadelerinde azalma AML'de hematopoezin stromal desteğinin azalmasına neden olabilir ve yetersiz hematopoeze yol açan etkenler arasında yer alabilir. Özet olarak hsa-miR-134-5p map kinaz yolağındaki genleri (BDNF, EGF, FGF, PDGF, TGF β) hedefleyerek yetersiz

hematopoezde ve hücrelerin kanserleşmesinde rolü olabilir ve aynı zamanda lösemi/lösemi kök hücrelerinin nişe yerleşmesine, kendini yenilemesine, uzun süre sessiz aşamada kalarak yaşamasına, ilaç direncine ve apoptozdan kurtulmasına yolaçarak AML patogenezinde rol oynayabilir. Her ne kadar AML'nin oluşumunda ve gelişiminde birçok neden rol alsada AML MKH'lerindeki miRNA ifade değişiklikleri bu molekülleri de kemik iliğindeki mikroçevresel etken olarak AML oluşumundan ve gelişimden sorumlu adaylar listesine eklemektedir.

Bu tez çalışması önemli hematopoetik mikroçevre bileşeni olan MKH'lerdeki DICER-1'in ve miRNA'ların MDS ve AML patogenezindeki katkısının ve miRNA'ların normal hematopoezde ve hematopoetik mikroçevrede düzenleyici rollerinin anlaşılması, niş hedefli miRNA temelli terapi geliştirilmesinde potansiyellik taşıması ve MKH ile sağlanan mikroçevresel mekanizmanın daha iyi anlaşılması bakımından önemlilik arz etmektedir.

Bu çalışma ile MDS ve AML MKH'lerindeki moleküler değişiklikler insanlarda da tanımlanmıştır ve tanımlanan aday miRNA'lar ile yapılacak fonksiyonel çalışmalar sonucunda bu miRNA'ların malignitenin başlamasında ve gelişiminde rolü olduğu kanıtlanırsa bu açıkça hastalara önerilen tedavi stratejileri üzerinde büyük etki yapacaktır. MDS/AML patogenezinde MKH'lerin rolünü açıklayan bu çalışma lösemik hücreler ve mikroçevre hücrelerini hedefleyen yeni terapiler sağlayabilir. Kök hücre aktivasyonu ve nişe geri dönüşüyle ilişkili moleküler mekanizmaların ve ilaç direncine katkıda bulunan lösemik ve normal hücreler arasındaki etkileşimlerle ilişkili mekanizmaların anlaşılması için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalardan elde edilecek veriler klinik denemelerde ilaç direncini yenmek ve yeni terapiler geliştirmek için önemli bir temel oluşturabilir. MKH'lerdeki bu moleküler değişiklikler malin hücrelerin gelişimini kolaylaştırabilir ve lökomogenezin özel bir mekanizması olabilir. Özellikle kemik iliği nişinin lökomogenez sürecine olan katkısını daha iyi anlamak, normal kök hücrelerin kendini yenilemesini olumsuz bir şekilde etkilemeksizin lösemi/lösemi kök hücrelerini yok etmeyi amaçlayan yeni hedefler sağlayabilir.

6.2. SONUÇ

Bu çalışma sonucunda;

22 MDS/AML hastası ve 8 sağlıklı kontrol kemik iliği aspirasyonu örneği kullanılmış, bu örneklerden MKH'ler izole edilmiş ve hücre kültürlerinde çoğaltılmıştır.

MKH karakterizasyonu için yüzey antijen özellikleri akım sitometrisiyle analiz edilmiş ve MKH'lerin osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri test edilmiştir.

MKH'lerden RNA izole edilmiş, mikrodizin yöntemi ile miRNA ifade profili çıkartılmış ve gruplar arasında ifadelerinde anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir.

Mikrodizin çalışmasının sonucunda ifadesinde farklılık görülen miRNA'lardan 13 tanesi eş zamanlı PZR yöntemi ile analiz edildiğinde de paralel sonuç vermiştir. Bunlardan 6 tanesinin ifade değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Sağlıklı kontrollerden elde edilen MKH'lerdeki DICER1 gen ifadesinin MDS ve AML hastalarının MKH'lerindeki ifadelerinden daha yüksek olduğu ve sağlıklı kontrollerden MDS'ye, MDS'den AML'ye doğru gittikçe ifadenin anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir.

Farklılık gösteren miRNA'ların hedeflediği genler bulunmuş, yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.

Eş zamanlı PZR yöntemi ile analiz edilen hedef genlerden 4 tanesinin ifadesinin hedefleyen miRNA ile beklenildiği gibi ters davrandığı tespit edilmiştir. 3 tanesinin ise beklenenden ters ifade değişimi göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'ların tahmini hedeflerinin AML ve MDS ile ilişkili olan birçok yolakta rol aldıkları tespit edilmiştir (Kanser, p53, apoptoz, MAPK ve AML sinyal yolları gibi).

Sonuç olarak bu çalışma Raaijmakers'ın farelerde yaptığı araştırmayı doğrulaması bakımından önemlilik arz eden bir insan çalışmasıdır. Bu çalışma MDS/AML

MKH'lerinde miRNA boyutundaki farklılıkların gösterildiği ve aynı zamanda MDS ve AML'nin karşılaştırıldığı nadir çalışmalardan biridir. Ayrıca çok az çalışmada MKH'lerde DICER-1 geninin ifade analizi araştırılmıştır. Bizim araştırmamızdan elde edilen bulgular DICER-1 ifadesindeki azalmanın MDS ve AML MKH'lerinde DICER-1 bağımlı miRNA'ların bazılarının biyogenezini zayıflattığı yönündedir. Yolak analizlerinde tespit edilen miRNA hedef genlerinin MDS/AML'de sıklıkla mutasyona uğrayan genler olması yanısıra mikroçevresel olarak HKH'ler üzerinde düzenleyici rolü olan genler olması MKH'lerde tanımlanan bu miRNA'ların MDS/AML patogenezinde rolleri olabileceğini göstermektedir.

İleride yapılması düşünülen çalışmalar aşağıda sıralanmıştır;

Bulgular ve Tartışma bölümlerinde detaylı olarak belirtildiği gibi DICER1 geninin ifadesi sağlıklı kontrollerden MDS'ye ve MDS'den AML'ye doğru dereceli olarak azalmaktadır. Bu azalma gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlıdır (n=29, p<0.001). DICER1 ifadesine protein seviyesinde de bakılması için çalışmalar başlamıştır. DICER1'in ifadesine protein seviyesinde de bakılacaktır.

Doğrulan hedef genlerin ifadesine protein seviyesinde de bakılması düşünülmektedir.

Bu projede mikrodizin yöntemi ile belirlenmiş ve eş-zamanlı PZR ile doğrulanan belirteç adayı miRNA'lar ile fonksiyonel çalışmaların gerçekleştirileceği yeni bir proje tasarlanmaktadır.

MDS/AML'de kemik iliği kökenli MKH'lerin transkriptomik ve proteomik analizlerinin sağlıklı kontrollerle karşılaştırılmasını amaçlayan bir çalışma planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 1992;82:358-67.
2. Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol.* 2008; 87: 777-95.
3. Tauro S, Hepburn MD, Peddie CM, Bowen DT, Pippard MJ. Functional disturbance of marrow stromal microenvironment in the myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2002; 16: 785-90.
4. Shetty V, Mundle S, Alvi S, Showel M, Broady-Robinson L, Dar S, Borok R, Showel J, Gregory S, Rifkin S, Gezer S, Parcharidou A, Venugopal P, Shah R, Hernandez B, Klein M, Raza A, Mundle S, Shetty V, et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. *Int. J. Hematol.* 1996; 63(4): 265-278.
5. Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Kamiyama R, Hirokawa K. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1997; 11(12): 2049-2054.
6. Mundle SD, Venugopal P, Cartlidge JD, et al. Indication of an involvement of interleukin-1 beta converting enzyme-like protease in intramedullary apoptotic cell death in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1996; 88: 2640-47.
7. Ramakrishnan A, Deeg HJ. A Novel Role for the Marrow Microenvironment in Initiating and Sustaining Hematopoietic Disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2009;9(1):21–28.
8. Giles F, Keating A, Goldstone A, Avivi I, Willman C, Kantarjian H. Acute myeloid leukemia. *Hematology.* 2002;73–110.
9. Bhatia R, McGlave PB, Dewald GW, Blazar BR, Verfaillie CM. Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood.* 1995;85:3636–3645.

10. Scadden DT. The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007;20(1):19-27.
11. Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, Andreeff M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat.* 2009;12(4):103-113.
12. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;5: 393-395.
13. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV et al. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17: 33-40.
14. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells.* 2007; 25: 2739–2749.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284: 143–147.
16. Jori FP, Napolitano MA, Melone MA et al. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem.* 2005;94:645–655.
17. Beyer NN, da Silva ML. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006:249–282.
18. Sacchetti B, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007; 131: 324–336.
19. Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature.* 2010; 464: 852–857.
20. Smith C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control.* 2003; 10(1): 9-16.
21. Orkin SH. Hematopoiesis: how does it happen? *Current Opinion in Cell Biology.* 1995; 7: 870-877.

22. Orkin SH. Development of the hematopoietic system. *Current Opinion in Genetics and Development*. 1996; 6: 597-602.
23. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* 2000; 1: 57–64.
24. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 2008 Feb 22; 132(4): 631–644.
25. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 1997 Nov; 91(5): 661–672.
26. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000 Mar; 404(6774):193–197.
27. Tesata NG, Dexter TM. The regulation of haematopoietic cell production. In *Postgraduate Haematology 4th Edition*. Ed. Hoffbrand AV, Lewis ST, Tuddenham EGD. Butterworth Heinemann Oxford 1999. pp1-12.
28. Domen J, Weissman IL. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today*. 1999 May; 5(5):201–208.
29. Domen J, Cheshier SH, Weissman IL. The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. *J Exp Med*. 2000;191:253-264.
30. Hao QL, Thiemann FT, Petersen D, et al. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood*. 1996 Nov;88(9):3306-3313.
31. Rogowski O, Sasson Y, Kassirer M, et al. Down-regulation of the CD62L antigen as a possible mechanism for neutrophilia during inflammation. *Br J Haematol*. 1998;101:666-669.
32. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cells: The Paradigmatic Tissue-Specific Stem Cell. *The American Journal of Pathology*. 2006 Aug; 169 (2): 338-346.

33. Heaney ML, Golde DW. Myelodysplasia. *New Engl J Med*.1999;340:1649–59.
34. Luzzatto AM. Sull anemia grave megaloblastica senza reporto hematologica correspondents (anemia pseudo-aplastica). *Riv Ven*. 1907; 47: 1937.
35. Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, et al. Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 1998; 83: 258-275.
36. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51: 189-199.
37. Greenberg P, Cox C, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 89(15): 2079-2088.
38. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic disease of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 3835-3849.
39. Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*. 2007;109:1536-1542.
40. Phelan JT II, Kouides PA, Bennett JM. Myelodysplastic syndromes: historical aspects and classification. In: Bennett JM, ed. *The Myelodysplastic syndromes*. New York: Marcel Dekker; 2002. 1-14.
41. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. French- American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Hematol*. 1976; 33:451-8.
42. Tüzüner N, Cox C, et al. Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS):new proposals. *Br J Haematol*. 1995; 91(3): 12-617.
43. Strupp C, Gattermann N, et al. Refractory anemia with excess of blast in transformation: analysis of reclassification according to the WHO proposal. *Leukemia research*. 2003; 27: 397-404.
44. Vallepsi T, Imbert M, et al: Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*.1998 Mar;83(3):258-275.
45. Goasguen E J: Is still possible to ameliorate the diagnosis of refractory anemia? *Leukemia Research*. 2003; 27: 201-203.

46. Ohyashiki K, Nishimaki J, et al. Re-evaluation of refractory anemia with excess blast in transformation. *Leukemia research*. 2001; 25:933-939.
47. Nösslinger T, Reisner R, et al. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World health organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from single institution. *Blood*. 2001; 98:2935-2941.
48. Aul C, Giagounidis A, et al. Evaluating the prognosis of patients with myelodysplastic syndromes. Review article. *Ann Hematol*. 2002; 81:485-497.
49. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008; 22:14–22.
50. Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1998; 9:1110.
51. Estey E, Keating M, et al. Application of the International scoring system for myelodysplasia to M.D. Anderson patients. Letter to the editor, *Blood*. 1999; 90(7): 2843-2844.
52. Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*. 2007;110:4385-4395.
53. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2011;364: 2496-2506.
54. Pisani DF, Rainaldi A. Management of high-risk myelodysplastic syndromes. *Clinical reviews in Oncology/ Hematology*. 2001; 40: 215-228.
55. Gilliland GD, Dunbar EC. Myelodysplastic syndromes. In: *Blood. Principles and Practice of Hematology*. Ed: Handin IR et al, second edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003; 355-377.
56. Chan G, Di Venuti G, Miller K. Danazol for the treatment of thrombocytopenia in patients with myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol*. 2002; 71: 166-171.
57. Lee JJ, Kim JH, et al. Comparison of prognostic scoring systems for myelodysplastic syndromes: a Korean multicenter study. *Leukemia research*. 1999; 23: 425-432.

58. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107:2099-2107.
59. Strom SS, Vélez-Bravo V, Estey EH. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. 2008;45:8-13.
60. Björk J, Albin M, Mauritzson N, Strömberg U, Johansson B, Hagmar L. Smoking and myelodysplastic syndromes. *Epidemiology*. 2000;11: 285-291.
61. Nisse C, Haguenoer JM, Grandbastien B, et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br J Haematol*. 2001;112:927-935.
62. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia*. 2005;19: 1912-1918.
63. Rigolin GM, Cuneo A, Roberti MG, et al. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. *Br J Haematol*. 1998;103:189-197.
64. Albin M, Bjork J, Welinder H. Cytogenetics and morphologic subgroups of myelodysplastic syndromes in relation to occupational and hobby exposures. *Scand J Work Environ Health*. 2003; 29: 378-387.
65. Benetatos L, Bourantas KL. Myelodysplastic syndromes. *Haema*. 2005; 8: 21-36.
66. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361:1872-1885.
67. Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL, et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: High proportion of cases with 17p deletion. *Blood*. 1998; 616-622.
68. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH. Therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplasia after high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2000; 95: 3273-3279.
69. Hellstrom-Lindberg E, Willman C, Barrett AJ, Sauntharajah Y. Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes. *Hematology*. 2000: 110-132.

70. Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Haematol.* 2001; 12:1841-1847.
71. Mhaweche P, Saleem A. Myelodysplastic syndrome review of the cytogenetic and molecular data. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001; 73:429-437.
72. Shali W, Helias C, Foher C, et al. Cytogenetic studies of a series of 43 consecutive secondary myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemias conventional cytogenetics FISH and multiplex FISH. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 168: 133-145.
73. Hofmann WK, L'Ybert M, Hoelzer D, Koeffler P. Myelodysplastic syndromes. *Hematol J.* 2004; 5:1-8.
74. Beaupre DM, Kurzrock R. RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol.* 1999; 17:1071– 1079.
75. Khosravi- Far R, Der CJ. The Ras signal transduction pathway. *Cancer metastasis Rev.* 1994; 13: 67-89.
76. Paquette RL, Landaw EM, Pierre RV, et al. N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood.* 1993; 82:590–599.
77. Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Jpn J Clin Oncol.* 2003; 33:153-160.
78. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet.* 2005; 365:1054–1061.
79. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 2005; 434:1144–1148.
80. Renneville A, Quesnel B, Charpentier A, et al. High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia.* 2006; 20:2067–2070.
81. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, His ED, Theil KS, Sekeres MA, Maciejewski JP. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood.* 2006; 108: 2173-2181.

82. Ingram W, Lea NC, Cervera J, *et al.* The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia*. 2006; 20: 1319-1321.
83. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, *et al.* The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001; 98:1752–1759.
84. Thiede C, Steudel C, Mohr B, *et al.* Analysis of FLT3- activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002; 99:4326–4335.
85. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6:493–505.
86. Zhang Y, Zhang M, Yang L, Xiao Z. NPM1 mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res*. 2007; 31:109–111.
87. Thiede C, Koch S, Creutzig E, *et al.* Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006; 107:4011–4020.
88. Shiseki M, Kitagawa Y, Wang YH, *et al.* Lack of nucleophosmin mutation in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with chromosome 5 abnormalities. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48:2141–2144.
89. Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2004; 3:722–724.
90. Harada H, Harada Y, Niimi H, *et al.* High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*. 2004; 103:2316–2324.
91. Ohashi H, Tsushita K, Utsumi M, *et al.* Relationship between methylation of the p15 gene and ectopic expression of the EVI-1 gene in myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*. 2001; 15:990–991.

92. Nucifora G, Laricchia-Robbio L, Senyuk V. EVI1 and hematopoietic disorders: history and perspectives. *Gene*. 2006; 368: 1–11.
93. Russell M, List A, Greenberg P, et al. Expression of EVI1 in myelodysplastic syndromes and other hematologic malignancies without 3q26 translocations. *Blood*. 1994; 84:1243–1248.
94. Raza A, Buonamici S, Lisak L, et al. Arsenic trioxide and thalidomide combination produces multi-lineage hematological responses in myelodysplastic syndromes patients, particularly in those with high pre-therapy EVI1 expression. *Leuk Res*. 2004; 28:791–803.
95. Morishita K, Parganas E, Williams CL, et al. Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300–400 kilobases on chromosome band 3q26. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:3937–3941.
96. Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, et al. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol*. 2000; 28:1423–1431.
97. Laricchia-Robbio L, Fazzina R, Li D, et al. Point mutations in two EVI1 Zn fingers abolish EVI1-GATA1 interaction and allow erythroid differentiation of murine bone marrow cells. *Mol Cell Biol*. 2006; 26:7658–7666.
98. Lai JL, Preudhomme C, Zandecki M, et al. Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia*. 1995; 9:370–381.
99. Bumber YA, Kondo Y, Chen X. RIL, a LIM gene on 5q31, is silenced by methylation in cancer and sensitizes cancer cells to apoptosis. *Cancer Res*. 2007; 67:1997–2005.
100. Quesned B, Guillerm G, Verseeque R, et al. Methylation of the P15NK4b gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. 1988; 91:2985–2990.
101. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997; 90: 1403–1409.

102. Tien HF, Tang JL, Tsay W. Methylation of the p15NK4b gene in myelodysplastic syndrome it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukemic transformation. *Br J Haematol*. 2001; 112:148-154.
103. Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol*. 2006; 76:23–32.
104. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*. 2002; 20:2429–2440
105. Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem Suppl*. 1998; 30–31:194–202.
106. Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, et al. Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood*. 2004; 104:1266–1269.
107. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2000; 96:3671–3674.
108. Blum W, Klisovic RB, Hackanson B, et al. Phase I study of decitabine alone or in combination with valproic acid in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2007; 25:3884–3891.
109. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, et al. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*. 2006; 108: 3271–3279.
110. Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia. Eds: Beutler E, Lichtman MA, Coller BC, Kipps TJ. New York: McGraw-Hill Co.: In: Williams Hematology; 1995. pp:272-98.

111. Golub TR, Arceci RJ. Acute myelogenous leukemia. In: Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2006. p. 591-644.
112. Beksaç M. Akut miyeloid lösemi. *Türkiye Klinikleri Hematoloji*. 2004;2:1-9.
113. Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology. Eds: Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004. pp:2063-76.
114. Jabbour EJ, Estey E, Kantarjian HM. Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:247-60.
115. Liesveld JL, Lichtman MA. Acute myelogenous leukemia In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Selig sohn U, Kaushansky K, Prchal JT eds. Williams Hematology. 7th ed. USA: Mc- Graw-Hill; 2006. p.1183-236.
116. Bendall LJ, Kortlepel K, Gottlieb DJ. Human acute myeloid leukemia cells bind to bone marrow stroma via a combination of beta-1 and beta-2 integrin mechanisms. *Blood*. 1993;82(10):3125-3132.
117. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 100: 2292-302.
118. Yanada M, Suzuki M, Kawashima K, et al. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol*. 2005;74:418-23.
119. Keating MJ, Smith TL, Kantarjian H, et al. Cytogenetic pattern in acute myelogenous leukemia: a major reproducible determinant of outcome. *Leukemia*. 1988;2:403-12.
120. Mrozek K, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD. Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 1997; 24:17-31.
121. Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood*. 1998;92:2322-33.

122. Löwenberg B, Suciú S, Archimbaud E, et al. Mitoxantrone versus daunorubicin in induction-consolidation chemotherapy Ñ the value of lowdose cytarabine for maintenance of remission, and an assessment of prognostic factors in acute myeloid leukemia in the elderly: final report of the Leukemia Cooperative Group of the European Organization for the Research and Treatment of Cancer and the Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Hovon Group Randomized Phase III Study AML-9. *J Clin Oncol.* 1998;16:872-81.
123. Whetton AD, Graham GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* 1999 Jun;9(6):233-238.
124. Hidalgo A, Sanz-Rodriguez F, Rodriguez-Fernandez JL, et al. Chemokine stromal cell-derived factor-1a modulates VLA-4 integrin-dependent adhesion to fibronectin and VCAM-1 on bone marrow hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol.* 2001;29:345-355.
125. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res.* 1994;137 (2 Suppl):S68-97.
126. Kossman SE, Weiss MA. Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for the treatment of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer.* 2000;88:620-4.
127. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Andersen MK, Skovby F. Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. *Leukemia.* 2002; 16:2177-84.
128. Moskowitz C, Dutcher JP, Wiernik PH. Association of thyroid disease with acute leukemia. *Am J Hematol.* 1992;39:102-7.
129. Willems E, Valdes-Socin H, Betea D, Beckers A, Beguin Y. Association of acute leukemia and auto immune polyendocrine syndrome in two kindreds. *Leukemia.* 2003;17:1912-4.
130. Wadleigh M, DeAngelo DJ, Griffin JD, Stone RM. After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies. *Blood.* 2005;105:22-30.

131. Kaushansky K. On the molecular origins of the chronic myeloproliferative disorders: it all makes sense. *Blood*. 2005;105:4187-4190.
132. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2005;106:1207-1209.
133. Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1617-1628.
134. Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2003;34:148-150.
135. Follows GA, Tagoh H, Lefevre P, Hodge D, Morgan GJ, Bonifer C. Epigenetic consequences of AML1-ETO action at the human c-FMS locus. *EMBO J*. 2003;22:2798-2809.
136. Hiebert SW, Reed-Inderbitzin EF, Amann J, Irvin B, Durst K, Linggi B. The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;30:177-183.
137. Liu S, Shen T, Huynh L, et al. Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 2005;65:1277-1284.
138. Klisovic MI, Maghraby EA, Parthun MR, et al. Depsipeptide (FR 901228) promotes histone acetylation, gene transcription, apoptosis and its activity is enhanced by DNA methyltransferase inhibitors in AML1/ETO-positive leukemic cells. *Leukemia*. 2003;17:350-358.
139. Mulloy JC, Cammenga J, Berguido FJ, et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood*. 2003;102:4369-4376.
140. Higuchi M, O'Brien D, Kumaravelu P, Lenny N, Yeoh EJ, Downing JR. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1:63-74.

141. Muller-Tidow C, Steffen B, Cauvet T, et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24:2890-2904.
142. Grisolano JL, O'Neal J, Cain J, Tomasson MH. An activated receptor tyrosine kinase, TEL/PDGFBetaR, cooperates with AML1/ETO to induce acute myeloid leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:9506-9511.
143. Yan M, Burel SA, Peterson LF, et al. Deletion of an AML1- ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17186-17191.
144. Tallman MS, Nabhan C, Feusner JH, Rowe JM. Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood.* 2002; 99:759–767.
145. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet.* 1999;23:166–75.
146. Michaud J, Wu F, Osato M, et al. In vitro analyses of known and novel RUNX1/AML1 mutations in dominant familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia: implications for mechanisms of pathogenesis. *Blood.* 2002;99:1364–72.
147. Mueller BU, Pabst T, Osato M, et al. Heterozygous PU.1 mutations are associated with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002;100:998–1007.
148. Pabst T, Mueller BU, Harakawa N, et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat Med.* 2001;7:444-451.
149. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood.* 2002;100:2717–23.
150. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Erpelinck C, Meijer J, et al. Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediaterisk AML. *Hematol J.* 2003;4:31–40.

151. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004;22:624–33.
152. Mizuki M, Schwable J, Steur C, et al. Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*. 2003;101:3164–73.
153. Wang H, Iakova P, Wilde M, et al. C/EBP alpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*. 2001;8:817–28.
154. Wang H, Goode T, Iakova P, Albrecht JH, Timchenko NA. C/EBPalpha triggers proteasome-dependent degradation of cdk4 during growth arrest. *Embo J*. 2002;21:930–41.
155. Johansen LM, Iwama A, Lodie TA, et al. c-Myc is a critical target for c/EBPalpha in granulopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2001;21:3789–806.
156. Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*. 1996;87:4025–39.
157. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. 2002;32:148–52.
158. Milne TA, Briggs SD, Brock HW, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell*. 2002;10:1107–1117.
159. Wiederschain D, Kawai H, Shilatifard A, Yuan ZM. Multiple MLL fusion proteins suppress p53-mediated response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2005;280:24315–24321.
160. Wang J, Iwasaki H, Krivtsov A, et al. Conditional MLL-CBP targets GMP and models therapy-related myeloproliferative disease. *EMBO J*. 2005;24:368–381.
161. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematol Oncol Clin N Am*. 1997;11:1221–37.
162. Owens BM, Hawley RG. HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*. 2002;20:364–79.

163. Dorsam ST, Ferrell CM, Dorsam GP, et al. The transcriptome of the leukemogenic homeoprotein HOXA9 in human hematopoietic cells. *Blood*. 2004 Mar; 103(5):1676-84.
164. Nakamura T, Largaespada DA, Shaughnessy Jr JD, Jenkins NA, Copeland NG. Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nat Genet*. 1996;12:149–53.
165. Calvo KR, Sykes DB, Pasillas MP, Kamps MP. Nup98-HoxA9 immortalizes myeloid progenitors, enforces expression of Hoxa9, Hoxa7 and Meis1, and alters cytokine-specific responses in a manner similar to that induced by retroviral co-expression of Hoxa9 and Meis1. *Oncogene*. 2002;21:4247–56.
166. Kasper LH, Brindle PK, Schnabel CA, Pritchard CE, Cleary ML, van Deursen JM. CREB binding protein interacts with nucleoporin-specific FG repeats that activates transcription and mediate NUP98–HOXA9 oncogenicity. *Mol Cell Biol*. 1999;19:764–76.
167. Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G. NUP98–HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J*. 2001;20:350–61.
168. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3(6):415–428.
169. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;111(1):47–54.
170. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998;395(6697):89–93.
171. Issa JP. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999;32(1):31–43.
172. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*. 1991;48(5):880–888.

173. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res.* 1997;57(5):837–841.
174. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97(9):2823–2829.
175. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(12):988–993.
176. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. *Science.* 2000; 287: 1442-1446.
177. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3: 393–403.
178. Aragona M, Maisano R, Panetta S, Giudice A, Morelli M, La Torre I, La Torre F. Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *Int J Oncol.* 2000; 17(5):981-989.
179. Caplan AI. What's in a name? *Tissue Eng. Part A* . 2010; 16: 2415–2417.
180. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell.* 2011; 9: 11–15.
181. Zuk PA, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002; 13: 4279–4295.
182. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928–1942.
183. De Coppi P, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 100–106.
184. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 153: 1133–1140.
185. Hida N, et al. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood derived mesenchymal cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 1695–1704.

186. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004; 103: 1669–1675.
187. In 't Anker PS, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004; 22: 1338–1345.
188. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315–317.
189. Okarma TB. Human primordial stem cells. *Hastings Cent Rep*. 1999; 29(2): 30.
190. Horowitz MC, Bothwell AL, Hesslein DG, Pflugh DL, Schatz DG. B cells and osteoblast and osteoclast development. *Immunol. Rev*. 2005; 208:141–153.
191. Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J. Cell. Physiol*. 2010; 222: 268–277.
192. Méndez-Ferrer S, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; 466: 829–834.
193. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, RS Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites *Leukemia*. 2008; 22: 941–950.
194. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7: 358–363.
195. Koh SH, Choi HS, Park ES, Kang HJ, Ahn HS, Shin HY. Co-culture of human CD34+ cells with mesenchymal stem cells increases trichostatin A-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 329: 1039–1045.
196. Pedemonte E, Benvenuto F, Casazza S, Mancardi G, Oksenberg JR, Uccelli A, et al. The molecular signature of therapeutic mesenchymal stem cells exposes the architecture of the hematopoietic stem cell niche synapse. *BMC Genomics*. 2007; 8: 65.
197. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000; 28: 875–884.

198. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*. 2005; 2(1): 8.
199. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004; 36:568–584.
200. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition, and mineralization. *Orthop. Clin. North Am*. 1984; 15:597–612.
201. Meghji S. Bone remodelling. *Br. Dent. J*. 1992; 172:235–242.
202. Muguruma Y, et al. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006; 107:1878–1887.
203. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J. Cell. Mol. Med*. 2004; 8:498–508.
204. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005; 105:2631–2639.
205. Moore KA. Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche. *Curr. Opin. Hematol*. 2004; 11:107–111.
206. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2005; 21:605–631.
207. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001; 414:98–104.
208. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978; 4(1-2): 7–25.
209. Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 770:70-78.
210. Verfaillie C, Hurley R, Bhatia R, McCarthy J. Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994; 16:201-224.

211. Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001; 97:2293–2299.
212. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 1994; 179:1677–1682.
213. Zhang J, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003; 425:836–841.
214. Calvi LM, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003; 425:841–846.
215. Arai F, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004; 118:149–161.
216. Cardier JE, Barbera-Guillem E. Extramedullary hematopoiesis in the adult Mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. 1997; 26:165–175.
217. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005; 121:1109–1121.
218. Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*. 2005; 20:349–356.
219. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 93-106.
220. Oh IH, Kwon KR. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. *Stem Cells*. 2010; 28: 1243-1249.
221. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1994 Nov; 1(8):661–673.
222. Visnjic D, et al. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004; 103:3258–3264.

223. El-Badri NS, Wang BY, Cherry, Good, R.A. Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 1998; 26:110–116.
224. Can A. Haematopoietic stem cells niches: interrelations between structure and function. *Transfus Apher Sci.* 2008; 38: 261-268.
225. Coskun S, Hirschi KK. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010; 90: 229-242.
226. Avecilla ST, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.* 2004; 10:64–71.
227. Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Dev. Biol.* 2005; 287:390–402.
228. Lacaud G, Robertson S, Palis J, Kennedy M, Keller G. Regulation of hemangioblast development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001; 938:96–108.
229. Abkowitz JL, Robinson AE, Kale S, Long MW, Chen J. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood.* 2003; 102:1249–1253.
230. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood.* 2005; 106:1901–1910.
231. Kiel MJ, Morrison SJ. Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity.* 2006; 25: 862-864.
232. Wang LD, Wagers, AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 643-655.
233. Guerrouahen BS, Al-hijji I, Tabrizi AR. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. *Stem Cells Int.* 2011; 2011:375857.
234. Parmar K, Mauch P, Vergilio JA, et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; 104:5431-5436.

235. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002; 109:625–637.
236. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med*. 2011 Mar; 208(3): 421-428.
237. Marcondes AM, Ramakrishnan A, Deeg HJ. Myeloid Malignancies and the Marrow Microenvironment: Some Recent Studies in Patients with MDS. *Curr Cancer Ther Rev*. 2009; 5(4):310-314.
238. Walkley CR, Shea JM, Sims NA, et al. Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 2007a;129:1081–1095.
239. Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, et al. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 2007b;129:1097– 1110.
240. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281– 297.
241. Santamaria C, Muntion S, Roson B, Blanco B, Lopez-Villar O, Carrancio S, et al. Impaired expression of DICER, DROSHA, SBDS and some microRNAs in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients. *Haematologica*. 2012; 97: 1218–1224.
242. Medyouf H, Mossner M, Jann JC, Nolte F, Raffel S, Herrmann C, et al. Myelodysplastic cells in patients reprogramm mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell Stem Cell*. 2014; 14: 824–837.
243. Martin MG, Welch JS, Uy GL, Fehniger TA, Kulkarni S, Duncavage EJ, et al. Limited engraftment of low-risk myelodysplastic syndrome cells in NOD/SCID gamma-C chain knockout mice. *Leukemia*. 2010; 24: 1662–1664.

244. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leukemia Res.* 2005; 29: 215–224.
245. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Gutierrez-Espindola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, et al. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leukemia Res.* 2008; 32: 1407–1416.
246. Gayh S, Cadeddu RP, Fröbel J. MDS-derived mesenchymal stromal cells are phenotypically, structurally and epigenetically altered resulting in insufficient stromal support for CD34+ HSPC. *Leuk Res.* 2013; 37: P-230.
247. Zhao ZG, Xu W, Yu HP, Fang BL, Wu SH, Li F, et al. Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett.* 2012; 317: 136–143.
248. Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Punturieri M, Castoldi GL, Lanza F. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica.* 2006; 91: 364–368.
249. Ferrer RA, Wobus M, List C, Wehner R, Schonefeldt C, Brocard B, et al. Mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndrome display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide. *Haematologica.* 2013; 98: 1677–1685.
250. Aanei CM, Flandrin P, Eloae FZ, Carasevici E, Guyotat D, Wattel E, et al. Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes. *Stem Cells Dev.* 2012;21(10): 1604–1615.
251. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest.* 2012; 92: 1330–1341.
252. Borojevic R, Roela R, Rodarte R, et al. Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. *Leuk Res.* 2004; 28(8): 831-844.

253. Chagraoui H, Wendling F, Vainchenker W. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia: Insight from mouse models (Review). *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19:399–412.
254. Deeg HJ, Beckham C, Loken MR, Bryant E, Lesnikova M, Shulman HM, Gooley T. Negative regulators of hemopoiesis and stroma function in patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk. Lymphoma.* 2000; 37(3-4): 405-414.
255. Blau O, Baldus CD, Hofmann WK, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood.* 2011; 118: 5583–5592.
256. de Oliveira FM, Lucena-Araujo AR, Favarin MD, Palma PVB, Rego EM, Falcao RP, et al. Differential expression of AURKA and AURKB genes in bone marrow stromal mesenchymal cells of myelodysplastic syndrome: correlation with G-banding analysis and FISH. *Exp Hematol.* 2013; 41: 198–208.
257. Iwata M, Pillai M, Ramakrishnan A, Hackman RC, Deeg HJ, Opdenakker G, et al. Reduced expression of inducible gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in monocytes from patients with myelodysplastic syndrome: correlation of inducible levels with the percentage of cytogenetically marked cells and with marrow cellularity. *Blood.* 2007; 109: 85–92.
258. Flores-Figueroa E, Gutierrez-Espindola G, Montesinos JJ, Arana-Trejo RM, Mayani H. *In vitro* characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk. Res.* 2002; 26(7): 677-686.
259. Marcondes AM, Mhyre AJ, Stirewalt DL, et al. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:2865–2870.
260. Wang H, Fan R, Wang XQ, Wu DP, Lin GW, Xu Y, et al. Methylation of Wnt antagonist genes: a useful prognostic marker for myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* 2013; 92: 199–209.

261. Schaniel C, Sirabella D, Qiu JJ, Niu XH, Lemischka IR, Moore KA. Wnt-inhibitory factor 1 dysregulation of the bone marrow niche exhausts hematopoietic stem cells. *Blood*. 2011; 118: 2420–2429.
262. Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N, et al. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature*. 2014; 506: 240–244.
263. Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood*. 2008;112:3026-3035.
264. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*; 2006;66:4553–4557.
265. Holyoake TL, Jiang X, Drummond MW, Eaves AC, Eaves CJ. Elucidating critical mechanisms of deregulated stem cell turnover in the chronic phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16:549–558.
266. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene*. 2004;23:7164–7177.
267. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006;20:161–171.
268. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, et al. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science*. 2008; 322:1861-1865.
269. Ninomiya M, Abe A, Katsumi A, et al: Homing, proliferation and survival sites of human leukemia cells in vivo in immunodeficient mice. *Leukemia*. 2007; 21:136-142.
270. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2000;95:309-13.
271. Koistinen P, Siitonen T, Mäntymaa P, et al. Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia*. 2001; 15(9):1433–1441.

272. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:11–21.
273. Konopleva M, Konoplev S, Hu W, et al. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by upregulation of antiapoptotic proteins. *Leukemia.* 2002;16:1713–1724.
274. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature.* 2006;44: 475–482.
275. Blau O, Hofmann WK, Baldus CD, et al. Chromosomal aberrations in bone marrow mesenchymal stroma cells from patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. *Exp Hematol.* 2007;35(2):221-229.
276. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sancez-Guijo FM, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia.* 2009;23(4):664-672.
277. Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 1991;5(10):1813–24.
278. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* 1993;75(5):843–54.
279. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408(6808):86–9.
280. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001;294(5543):862–4.
281. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2309–15.
282. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III DROSHA initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415–9.

283. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95–8.
284. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human DICER preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002;21(21):5875–85.
285. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363–6.
286. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631–40.
287. Czech B, Zhou R, Erlich Y, Brennecke J, Binari R, Villalta C, Gordon A, Perrimon N, Hannon GJ. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol. Cell*. 2009;36(3):445–56.
288. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol. Cell*. 2010;38(3):323–32.
289. Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. 2011;17(2):312–26.
290. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet*. 2008;9(2):102–14.
291. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet*. 2004;5(7):522–31.
292. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006; 9, 189-198.

293. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 2257-2261.
294. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6: 259–269.
295. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*. 2007; 302 (1): 1–12.
296. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004; 101: 2999–3004.
297. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*. 2004; 303: 83–86.
298. Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F, Liuzzi F, Lulli V, Morsilli O, Santoro S, Valtieri M, Calin GA, Liu CG, Sorrentino A, Croce CM, Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102: 18081–18086.
299. Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP alpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. 2005;123(5):819-831.
300. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R, Cimmino A, Aqeilan R, Volinia S, Bhatt D, Alder H, Marcucci G, Calin GA, Liu CG, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103: 5078–5083.

301. Georgantas III RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM, Civin CI. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104: 2750–2755.
302. Montagner et al. MicroRNAs in hematopoietic development. *BMC Immunology*. 2014 Mar; 15:14.
303. Lakshmipathy U, Hart RP. Concise review: microRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2008; 26: 356–363.
304. Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol*. 2011; 39: 608–616.
305. Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, Bak M, Kauppinen S, Kassem M. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr; 108(15):6139-44.
306. Yang Z, et al. MicroRNA hsa-miR-138 inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells through adenovirus EID- 1. *Stem Cells Dev*. 2011c; 20: 259–267.
307. Huang J, Zhao L, Xing L, Chen D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 2010; 28: 357–364.
308. Zhang JF, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix. *Mol. Biol. Cell*. 2011a; 22: 3955–3961.
309. Sorrentino A, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol*. 2008; 36: 1035–1046.
310. Tomé M, et al. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2011 Jun; 18(6): 985–995.

311. Collino F, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*. 2010 Jul; 5(7): e11803.
312. Pillai MM, Yang X, Balakrishnan I, Bemis L, Torok-Storb B. MiR-886-3p down regulates CXCL12 (SDF1) expression in human marrow stromal cells. *PLoS One*. 2010 Dec; 5(12): e14304.
313. Zernecke A, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal*. 2009 Dec; 2(100): ra81.
314. van Solingen C, et al. MicroRNA-126 modulates endothelial SDF-1 expression and mobilization of Sca-1+/Lin- progenitor cells in ischemia. *Cardiovasc. Res*. 2011; 92: 449–455.
315. Zhang Y, et al. A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2011c; 108: 9863–9868.
316. Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, Lam J, Chari R, Wegrzyn J, et al. Genome-wide identification of human micro-RNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood*. 2011; 117: 595–607.
317. Hussein K, Theophile K, Busche G, Schlegelberger B, Gohring G, Kreipe H, et al. Aberrant microRNA expression pattern in myelodysplastic bone marrow cells. *Leuk Res*. 2010; 34: 1169–1174.
318. Sokol L, Caceres G, Volinia S, Alder H, Nuovo GJ, Liu CG, et al. Identification of a risk dependent microRNA expression signature in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 2011; 153: 24–32.
319. Dostalova Merkerova M, Krejcik Z, Votavova H, Belickova M, Vasikova A, Cermak J. Distinctive microRNA expression profiles in CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19: 313–319.
320. Pons A, Nomdedeu B, Navarro A, Gaya A, Gel B, Diaz T, et al. Hematopoiesis-related microRNA expression in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*. 2009; 50: 1854–1859.

321. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun;435(7043):834-8.
322. Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, et al. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clin Chem*. 2010; 56: 998–1006.
323. Zuo Z, Calin GA, de Paula HM, Medeiros LJ, Fernandez MH, Shimizu M, et al. Circulating microRNAs let-7a and miR-16 predict progression-free survival and overall survival in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2011; 118: 413–415.
324. Marcucci G, Radmacher MD, Maharry K, Mrozek K, Ruppert AS, Paschka P, et al. MicroRNA expression in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*. 2008 May;358(18):1919-28.
325. Havelange V, Garzon R, Croce CM. MicroRNAs: new players in acute myeloid leukaemia. *British journal of cancer*. 2009 Sep 1;101(5):743-8.
326. Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PloS one*. 2008;3(5):e2141.
327. Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008; 111: 3183–3189.
328. Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJ, Lowenberg B. MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008 May 15;111(10):5078-85.
329. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286(5439):531-537.
330. Mi S, Lu J, Sun M, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(50):19971- 19976.

331. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010 Feb 1;28(4):596-604.
332. Simon R, Lam A, Li M, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform*. 2007;3(301):11-7.
333. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1998;95(25):14863-8.
334. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004;20(17):3246-8.
335. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
336. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk - database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of 3 genomes. *Journal of Biomedical Informatics*. 2011; 44: 839-7.
337. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*. 1995; 9:2736-46.
338. Rupec RA, Jundt F, Rebholz B, et al. Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. *Immunity*. 2005;22:479-491.
339. Aizawa S, Nakano M, Iwase O, Yaguchi M, Hiramoto M, Hoshi H, Nabeshima R, Shima D, Handa H, Toyama K. Bone marrow stroma from refractory anemia of myelodysplastic syndrome is defective in its ability to support normal CD34-positive cell proliferation and differ-entiation in vitro. *Leuk Res*. 1999; 23:239-45.

340. Tauro S, Hepburn MD, Bowen DT, Pippard MJ. Assessment of stromal function, and its potential contribution to deregulation of hematopoiesis in the myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2001; 86:1038–45.
341. Klaus M, Stavroulaki E, Kastrinaki MC, et al. Reserves, Functional, Immunoregulatory, and Cytogenetic Properties of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Stem Cells Dev*. 2010;19(7):1043-1055.
342. Kastrinaki MC, Pontikoglou C, Klaus M, Stavroulaki E, Pavlaki K, Papadaki HA. Biologic Characteristics of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Myelodysplastic Syndromes. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011; 6(2):122-130.
343. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Fröbel J, Brückner B, Kündgen A, Fenk R, Bruns I, Zilkens C, Hermsen D, Gattermann N, Kobbe G, Germing U, Lyko F, Haas R, Schroeder T. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. 2013 Sep;27(9):1841-51.
344. Aanei CM, Eloae FZ, Flandrin-Gresta P, Tavernier E, Carasevici E, Guyotat D, et al. Focal adhesion protein abnormalities in myelodysplastic mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*. 2011;317(18):2616-29.
345. Varga G, Kiss J, Varkonyi J, Vas V, Farkas P, Paloczi K, et al. Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Pathol Oncol Research*. 2007; 13(4): 311–319.
346. Awaya N, Rupter K, Bryant E, Torok-Storb B. Marrow stromal cells are not derived from the malignant clone in myelodysplastic syndromes (MDS). *Blood*. 2001; 98(Suppl 1):1487a.
347. Soenen-Cornu V, Tourino C, Bonnet ML, Guillier M, Flamant S, Kotb R, et al. Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal clonal markers and support short- and long-term hematopoiesis in vitro. *Oncogene*. 2005; 24: 2441–2448.
348. Zhang W, Knieling G, Vohwinkel G, Martinez T, Kuse R, Hossfeld DK, Dührsen U. Origin of stroma cells in long-term bone marrow cultures from patients with acute myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 1999; 78(7):305-14.

349. Roela RA, Carraro DM, Brentani HP, Kaiano JH, Simão DF, Guarnieiro R, Lopes LF, Borojevic R, Brentani MM. Gene stage-specific expression in the microenvironment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.* 2007; 31(5):579-89.
350. Votavova H, Grmanova M, Merkerova MD, Belickova M, Vasikova A, Neuwirtov R, Cermak J. Differential Expression of MicroRNAs in CD34+ Cells of 5q- Syndrome. *Journal of Hematology & Oncology.* 2011Jan; 4:(1).
351. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G. DICER is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem.* 2005;280:9330 – 9335.
352. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science.* 2005;308:833– 838.
353. Oskowitz AZ, Lu J, Penforis P, Ylostalo J, McBride J, Flemington EK, Prockop DJ, Pochampally R. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(47):18372-7.
354. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genet.* 2007;39:673–677.
355. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell.* 2009;136:586–91.
356. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of DICER associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Science.* 2005;96: 111–115.
357. Andreeff M, Wang R, Davis RE, et al. Proteomic, Gene Expression, and Micro-RNA Analysis Of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells In Acute Myeloid Leukemia Identifies Pro-Inflammatory, Pro-Survival Signatures *In Vitro* and *In Vivo.* *Blood.* 2013 Nov;122 (21):3685.

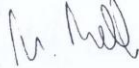
358. Lilly AJ, Johnson WE, Bunce CM. The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int.* 2011 Sep; 2011: 274564.
359. Ratajczak MZ, Zuba-surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia.* 2006; 20: 1915-1924.
360. Zhang YZ, DA WM. Expression of SDF-1 gene in bone marrow mesenchymal stem cells of patients with myelodysplastic syndrome. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2006; 14(2):281-4.
361. Renstrom J, Kröger M, Peschel C, Oostendorp RA. How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact.* 2010; 184: 7-15.
362. Estey EH. Modulation of angiogenesis in patients with myelodysplastic syndrome. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* 2004; 17(4): 623-639.
363. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000, 96(6): 2240-2245.
364. Brunner B, Gunsilius E, Schumacher P, Zwierzina H, Gastl G, Stauder R. Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2002; 11(1): 119-125.
365. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64.

8. EKLER

EK1: Etik Kurul Onayı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU			
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Myelodisplastik sendrom (MDS) ve akut myeloid lösemi (AML) hastalarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) karakterizasyonu ile gen/mikro RNA (miRNA) ifade profillerinin sağlıklı kontroller ile karşılaştırmalı analizi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu	
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA	
	TELEFON	0312 595 82 27	
	FAKS	0312 310 63 70	
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr	
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Osman İLHAN	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Hematoloji	
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı	
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI		
	DESTEKLEYİCİ		
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>	
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>		
Diğer ise belirtiniz:Laboratuvar çalışması			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	<input checked="" type="checkbox"/>	
	ÇOK MERKEZLİ	<input type="checkbox"/>	
	ULUSAL	<input checked="" type="checkbox"/>	
	ULUSLARARASI	<input type="checkbox"/>	

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
20 Kasım 2014
ASLI GİBİDİR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza: 

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU


ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Myelodisplastik sendrom (MDS) ve akut myeloid lösemi (AML) hastalarının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) karakterizasyonu ile gen/mikro RNA (miRNA) ifade profillerinin sağlıklı kontroller ile karşılaştırmalı analizi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BASKANIN UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	M. Mellî
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	iznil
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Rahatsız
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	Derste
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tabii Biyokimya	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü.Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü.Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Güngör UTKAN	Tabii Onkoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	iznil
Doç.Dr.A. Ruhu SOYLU	Biyofizik	H.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tabii Genetik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Mühibe SUTAY	İşletme		E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma



Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ 
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Myelodisplastik sendrom (MDS) ve akut myeloid lösemi (AML) hastaların iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) karakterizasyonu ile gen. RNA (miRNA) ifade profillerinin sağlıklı kontroller ile karşılaştırmalı analizi		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	10.10.2014	2	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GUVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
Diğer	<input checked="" type="checkbox"/>	Hedeflenen hasta ve sağlıklı kontrol sayısına ulaşmadı. güçlükler nedeniyle çalışma süresinin Kasım 2015'e kadar uzatılması, hasta ve sağlıklı kontrol kemik iliği aspirasyonu örneklerinin teminindeki güçlükler nedeniyle çalışmaya Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hematoloji Kliniği'nde Prof.Dr.Ferit Avcu ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Kliniği'nden Doç.Dr.Zeynep Arzu Yeğin yardımcı araştırmacı olarak çalışmaya dahil edilmiş hakkında alınan protokol değişikliği		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:17-756-14	Tarih: 27 Ekim 2014	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	



20 Kasım 2014
ASLI GIBIDIR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Mellî

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hakan ÖZDOĞAN

Doğum Yeri: Nevşehir/Ürgüp

Doğum Tarihi: 10.07.1978

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ürgüp lisesi

Lisans: Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yayınlar

Yucel N, Aslim B, **Ozdogan H**. In vitro antimicrobial effect of *Satureja wiedemanniana* against *Bacillus* species isolated from raw meat samples. *J Med Food*. 2009 Aug;12(4):919-23.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Hakan Ozdogan*¹, Bala Gur Dedeoglu¹, Arzu Atalay¹, Sevil Kose², Zeynep Arzu Yegin³, Ferit Avcu⁴, Duygu Uckan Cetinkaya², Osman Ilhan⁵. “Characterization and MicroRNA Expression Profile Analysis of Mesenchymal Stem Cells Derived From Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid leukemia (AML) Patients and Comparison with Healthy Controls”. EBMT kongresi. İstanbul. 2015. Poster sunumu.

10. TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

Tezden yayın yapılmasına yönelik çalışmalara başlanılmıştır.

