

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

**MYELODİPLASTİK SENDROM (MDS) VE AKUT MYELOİD LÖSEMİNİN
(AML) EPİGENETİK PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ SURETİYLE MDS VE
AML PROGNOZUNDA YENİ MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN
TANIMLANMASI**

HÜLYA SÜMER ÇELEBİ

Danışman Öğretim Üyesi

PROF. DR. HİLAL ÖZDAĞ

Eylül

2014

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.

Hülya SÜMER ÇELEBİ

İmzası

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ danışmanlığında, Hülya SÜMER ÇELEBİ tarafından hazırlanan bu çalışma .../.../.... Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :

İmza:

Üye :

İmza:

Üye :

İmza:

Üye :

İmza:

Üye :

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

MYELODİPLASTİK SENDROM (MDS) VE AKUT MYELOİD LÖSEMİNİN (AML) EPİGENETİK PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ SURETİYLE MDS VE AML PROGNOZUNDA YENİ MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN TANIMLANMASI

Hülya SÜMER ÇELEBİ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof.Dr. Hilal ÖZDAĞ

Myelodisplastik sendrom (MDS), hematopoiezinin bozulması ile ortaya çıkan, hücrel fonksiyon bozukluğu ile karakterize ve akut myeloid lösemiye (AML) dönüşme riski yüksek olan bir hastalıktır. Hematopoietik kök hücrelerin nicelik ve niteliğinde meydana gelen hasarlar sonucunda MDS hastalarının %35-40'ında giderek kötüleşen sitopeni ile birlikte AML'ye dönüşüm görülmektedir. Heterojen özelliğe sahip olan MDS hastalığında daha etkin teşhis ve tedavi sağlanması amacıyla FAB (French-American-British) ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından yapılan sınıflandırmalarda çeşitli kriterler dikkate alınmış olmasına rağmen MDS'ye ilişkin prognozun öngörülmesinde henüz tam anlamıyla başarı sağlanamamıştır.

Bugüne kadar MDS'nin patogenezinin ait moleküler mekanizmanın aydınlatılmasında önemli katkılar sağlayan pek çok araştırma yapılmış ve hastalıkla ilişkilendirilen sitogenetik, genetik ve epigenetik değişimler tespit edilmiştir. Özellikle bazı tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanan metilasyon paternindeki değişikliklerin hastalığın ortaya çıkmasına neden olan epigenetik süreçlerin arasında olduğu belirlenmiştir ancak yine de yapılan tüm bu çalışmalar ve elde edilen veriler MDS'nin moleküler mekanizmasını, alt tiplerini, alt tipleri birbirinden ayıran moleküler sınırları ve hastalığın prognozunu bütünüyle açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu durum MDS'ye yönelik tedavi rejimlerinin spesifitesini ve etkinliğini de olumsuz etkilemektedir. MDS'nin moleküler mekanizmasında önemli bir bileşen olan epigenetiğin tedavide kullanılabileceğinin anlaşılması ile tedavi protokolüne giren ve demetile edici bir ajan olan 5-azasitidin'in yüksek riskli MDS hastalarının %50'sinde sitopeniyi iyileştirdiği bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkılarak planlanan tez çalışmasında MDS ve MDS-AML hastalarında 5-azasitidin'in epigenetik profil üzerine etkisinin değerlendirilmesi ile

teşhis ve tedavide kullanılabilecek yeni moleküler belirteçlerin tanımlanması amaçlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında 18 hastanın tedavi öncesi ve sonrası, 15 hastanın sadece tedavi öncesi ve 5 sağlıklı kontrolün kemik iliği örneği alınmıştır. CD34⁺/CD117⁺/CD133⁺ hücrelerden izole edilen DNA kullanılarak promotor arraylerle metilasyon analizleri yapılmıştır. Biyoinformatik analiz ile tespit edilen genlerin ekspresyon seviyeleri ise RNA örnekleri üzerinden QRT-RT PCR ile belirlenmiştir.

5-azasitidin'in genom ebadında metilasyon profili üzerine olan etkilerinin MDS ve MDS-AML hasta örnekleri kullanılarak ilk kez incelendiğinde bu çalışmada gerçekleştirilen metilasyon analizleri sonucunda tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırmasında 58, tedavi öncesi (eşli) örnekler ve kontrol karşılaştırmasında 452, tedavi öncesi (tek) ve kontrol karşılaştırmasında 614, tedavi öncesi tüm örnekler ve kontrol karşılaştırmasında 415 ve tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında ise 377 farklı metilasyon gösteren bölge tespit edilmiştir. Karşılaştırmalarda, doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksinite, fokal adezyon, kemokin sinyal yolağı, endositozis ve aktin hücre iskeleti regülasyonu ön plana çıkan yolaklardır. Bu çalışma ile MDS'nin moleküler patogenezinde önemli bir yeri olan epigenetik regülasyonun rolü MDS ve MDS-AML hastalarında DNA metilasyon değişimleri seviyesinde ortaya konmuştur.

2014, 153 sayfa

Anahtar kelimeler: Myelodisplastik sendrom, akut myeloid lösemi, epigenetik, DNA metilasyonu

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IDENTIFICATION OF NEW MOLECULAR MARKERS FOR THE PROGNOSIS OF MYELODYSPLASTIC SYNDROME AND ACUTE MYELOID LEUKEMIA THROUGH THE DETERMINATION OF EPIGENETIC PROFILE OF MDS AND AML

Hülya SÜMER ÇELEBİ

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of clonal hematopoietic stem cell diseases characterized by cytopenias, dysplastic morphological and immunophenotypical changes in one or more cell lines, ineffective hematopoiesis and increased risk of development of acute myeloid leukemia (AML). The genetic and molecular changes on stem cells cause leukemic transformation of dysplastic clone in about %35 to %40 of the cases during the course of the disease. MDS covers a heterogeneous group of diseases which could carry difficulties on diagnosis and effective treatment. The diagnostic criteria were described formerly by FAB classification. Today updated WHO (2008) classification is used for diagnosis of the diseases within this spectrum. Although the diagnostic criteria are described, the prognosis of the disease could be different for the patients presenting the same disease.

There have been many studies shedding light on the molecular mechanism of MDS pathogenesis revealing cytogenetic, genetic and epigenetic changes. Previous research on the pathogenesis of the disease revealed the inactivation of some tumor suppressor genes by methylation. But these data is not enough to explain all of the molecular changes and their correlation with morphological types or prognosis of the disease. Lack of knowledge on the full aspect of the molecular pathogenesis of the disease prevents effective specific therapy solutions against the disease.

5-azacitidine has been used as a demethylating agent on MDS therapy especially for high risk MDS patients. This drug can successfully treat cytopenia in %50 of the patients. In this study, our aim was to evaluate the effects of the 5-azacitidine in MDS and MDS- AML

patients epigenetic profile and to identify new molecular markers for diagnosis and treatment.

In this dissertation, we collected bone marrow samples from 18 patients before and after therapy with 5-azacitidine, 15 patients only before therapy and 5 healthy controls. DNA was extracted from CD34⁺/CD117⁺/CD133⁺ cells for methylation analysis using promoter arrays in order to evaluate the methylated genes. Expression level of genes determined through bioinformatic analysis was analyzed with QRT-RT PCR.

In this study, the impact of 5-azacitidine on genome-wide methylation profile was evaluated on MDS and MDS-AML patients for the first time. The methylation analysis identified 58 differentially methylated region (DMR) in pre-treatment vs post-treatment, 452 DMR in pre-treatment (single) samples vs control, 614 DMR in pre-treatment (single) samples vs control, 415 DMR all in pre-treatment samples and control, 377 DMR in post-treatment samples and control comparisons. The pathways that were highlighted in this comparisons were natural killer cell mediated cytotoxicity, focal adhesion, chemokine signaling pathway, endocytosis and regulation of actin cytoskeleton. This study revealed the role of the epigenetic regulation which is important in the molecular pathogenesis of the MDS in MDS and MDS-AML patients with DNA methylation differentiation levels.

2014, 153 pages

Keywords: Myelodysplastic syndrome, acute myeloid leukemia, epigenetics, DNA methylation

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, bundan sonraki çalışma hayatım boyunca da bilgi, destek ve fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım değerli danışman hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ'a,

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde maddi destek sağlayan, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB),

Tez çalışmasında kullandığım materyallerin toplanmasında yardım ve desteğini esirgemeyen, çalışma süresince değerli fikirlerini paylaşarak katkıda bulunan sevgili hocam Prof. Dr. Işın Kuzu'ya,

Doktoranın zorlu yollarında birlikte yürüdüğüm, mutlulukları ve üzüntüleri paylaştığım her zaman yardımını ve desteğini gördüğüm canım arkadaşım Dr. Nevin Belder'e,

Tez çalışmamın biyoinformatik analizlerinin gerçekleştirilmesinde büyük bir sabır, azim ve özveri gösteren sevgili arkadaşım Blm. Uzm. Zeynep Özkeserli'ye,

Birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum, yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili Dr. Yeşim Doğan'a, Dr. Nilgün Tekin'e, Dr. Günseli Deniz Çubukçuoğlu'na, Dr. Semih Dalkılıç'a, Blm. Uzm. Seda Taşır Yılmaz'a, Blm. Uzm. Özge Cumaogulları Eker'e, Blm.Uzm. Funda Demirsoy'a ve Blm. Uzm. Mehmet Korkmaz'a,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı personeline,

Tez çalışmamı 109S299 nolu proje olarak 2515-Bilim ve Teknolojide Avrupa İşbirliği (COST-BM0801) programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

Hayatım boyunca beni her konuda destekledikleri ve hep yanımda oldukları için sevgili aileme,

Bu zorlu süreçte sonsuz sabrı ve sevgisiyle hep yanımda olan, hayat arkadaşım canım eşim
Osman Çelebi'ye yaşattığı tüm güzellikler ve her şey için,

8 aydır her anı birlikte geçirdiğim, yakında aramıza katılacak olan kızıma,

Sonsuz teşekkür ederim.

Hülya SÜMER ÇELEBİ

Eylül 2014

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Hematopoiezis	3
2.2. Hematolojik Maligniteler	5
2.3. Myelodisplastik Sendrom	7
2.3.1. Tarihçe ve Epidemiyoloji	8
2.3.2. Klinik ve Morfolojik Özellikler	9
2.3.3. Sınıflandırma	11
2.3.4. Prognoz	13
2.3.5. Etyoloji ve Patogenez	15
2.3.5.1. Sitogenetik Değişimler	18
2.3.5.2. Moleküler Değişimler	21
2.4. Epigenetik	27
2.4.1. DNA Metilasyonu	27
2.4.2. Histon Modifikasyonu	29
2.4.3. RNA İnterferans	30
2.5. MDS'den AML'ye Transformasyon	31
2.6. Akut Myeloid Lösemi	32
2.7. MDS ve AML Odağında Kanserde Epigenetik	34
2.8. Myelodisplastik Sendromda Tedavi	40
2.8.1. Destekleyici Bakım	41
2.8.2. İmmüsupresif Tedavi	42
2.8.3. Allojenik Hematopoietik Kök Hücre Transplantasyonu	42

2.8.4. Epigenetik Tedavi Yaklaşımları	42
2.8.4.1 Hipometile Edici Ajanlar	43
2.8.4.2. Hipometile Edici Ajanların Etki Mekanizması	43
2.9. MDS ve AML’de Genom Boyu Analizler	44
2.10. Genomboyu Çalışmalarda Biyoinformatik Analiz ve Veri Madenciliği.....	50
3. GEREKÇE VE AMAÇ	52
4. MATERYAL VE YÖNTEM	57
4.1. Materyal.....	57
4.2. Yöntem	59
4.2.1. Kemik İliği Aspirasyonu	59
4.2.2. Kemik İliği Aspiratından Mononükleer Hücrelerin Ayırıştırılması	59
4.2.3. CD34 ⁺ /CD117 ⁺ /CD133 ⁺ Hematopoietik Kök Hücrelerin İzolasyonu	60
4.2.3.1. Manyetik İşaretleme	60
4.2.3.2. LS Kolonlarla Manyetik Ayırıştırma.....	60
4.2.4. Fenol -Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi ile DNA İzolasyonu.....	61
4.2.5. RNA İzolasyonu	62
4.2.6. DNA ve RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi.....	62
4.2.7. DNA ve RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	63
4.2.8. Metilli DNA’nın İmmünopresipitasyonu	64
4.2.8.1. İmmünopresipitasyon Veriminin Değerlendirilmesi	66
4.2.9. Tüm Genom Amplifikasyonu.....	67
4.2.10. PCR Pürifikasyonu	68
4.2.11. Metilasyon Analizi	68
4.2.12. Metilasyon Analizinden Elde Edilen Verinin Biyoinformatik Analizi	71
4.2.12.1. Nimblescan	71
4.2.12.2. Charm Algoritması ile Farklı Metilasyon Gösteren Bölgelerin Belirlenmesi.....	72
4.2.12.3. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerindeki Genlerin Belirlenmesi.....	73
4.2.12.4. Gen Ontoloji, Zenginleşme ve Yolak Analizleri	73
4.2.13. RNA Örneklerinin Bütünlük ve Kalite Analizi	74
4.2.14. cDNA sentezi.....	76
4.2.15. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)...	76
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	78
5.1. DNA ve RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi.....	78
5.2. DNA ve RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	81

5.3. Metilli DNA'nın İmmünopresipitasyonu	82
5.4. İmmünopresipitasyon Veriminin QPCR ile Değerlendirilmesi.....	82
5.5. İmmünopresipitasyon Sonucunda Elde Edilen DNA'nın Miktar Tayini Sonuçları.....	85
5.6. Tüm Genom Amplifikasyonu ve PCR Pürifikasyonu Sonuçları.....	86
5.7. Biyoinformatik Analiz Sonuçları.....	87
5.7.1. Kalite Kontrol Sonuçları.....	87
5.7.2. Normalizasyon Sonuçları	90
5.7.3. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerine İlişkin Sonuçlar	91
5.7.4. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerine Ait Çok Boyutlu Ölçekleme Analizi Sonuçları	92
5.7.5. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerinin (DMR) Grafikselsel Gösterimi	94
5.7.6. Farklı Metilasyon Gösteren Genlere İlişkin Gen Ontoloji ve Yolak Analizleri.....	96
5.8. RNA Örneklerinin Bütünlük ve Kalite Analizi	112
5.9. Real Time QRT-PCR Sonuçları	113
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	117
6.1. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	118
6.2. Tedavi Öncesi (eşli) ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	123
6.3. Tedavi Öncesi (tek) ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	125
6.4. Tedavi Öncesi (tüm örnekler) ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	127
6.5. Tedavi Sonrası ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	129
6.6. Real Time QRT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	130
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	133
KAYNAKLAR.....	136
ÖZGEÇMİŞ	151

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Hematopoietik kök hücre farklılaşması (7).....	4
Şekil 2. 2. Hematolojik malignitelerin patogenezi (14).....	6
Şekil 2. 3. MDS'nin hematolojik malignitelerdeki yeri	7
Şekil 2. 4. MDS'de displastik eozinofil, anormal hipogranülasyon (30)	10
Şekil 2. 5. MDS'de blast ve monoloblu nötrofil (30).....	10
Şekil 2. 6. MDS'de hematopoietik kök hücre ve progenitör hücre popülasyonunda görülen sayısal farklılıklar (46)	16
Şekil 2. 7. Myelodisplastik sendrom'da fenotipik heterojenitenin genetik temeli (69)	19
Şekil 2. 8. Kromozom 5'te yaygın delesyon görülen bölgeler ve önemli genler (75).....	20
Şekil 2. 9. MDS'de epigenetik regülatör olan genlerdeki mutasyon sıklıkları (92).....	22
Şekil 2. 10. DNA metilasyonu ve demetilasyon yolağında görevli genlerdeki mutasyonlar (96)	23
Şekil 2. 11. DNA metilasyonu, sitozine metil grubu takılması (111)	28
Şekil 2. 12. Promotor bölgedeki CpG adacık metilasyonunun gen ekspresyonu üzerindeki etkisi (111).....	28
Şekil 2. 13. Histon modifikasyonu, aktif kromatin yapısı (158)	29
Şekil 2. 14. Histon modifikasyonu, susturulmuş kromatin yapısı (158)	30
Şekil 2. 15. MDS'nin çok basamaklı patogenezi (19).....	31
Şekil 2. 16. MDS'den AML'ye progresyona ilişkin model (169).....	32
Şekil 2. 17. Hematolojik malignitelerde epigenetik (183).....	35
Şekil 2. 18. Myelodisplastik sendromda için tedavi algoritması (217)	41
Şekil 2. 19. Hipometile edici ajanların etki mekanizması (89)	44
Şekil 2. 20. Bilgi keşfi sürecinde veri madenciliği (243)	51
Şekil 3. 1. MDS ve AML'de hipometile edici ajanların etkisini araştıran genom boyu metilasyon ve transkriptom çalışmalarının özeti.....	53
Şekil 3. 2. MDS'de metilasyon profilini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların özeti... 53	
Şekil 4. 1. Yöntem akış şeması.....	59
Şekil 4. 2. Metilli DNA'nın İmmünopresipitasyonu	65
Şekil 4. 3. Metilasyon analizi çalışma akışı.....	68

Şekil 4. 4. DNA metilasyon array yapısı (244)	71
Şekil 5. 1. DNA örneklerine ait temsili %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	81
Şekil 5. 2. RNA örneklerine ait temsili %1'lik agaroz jel görüntüsü.....	81
Şekil 5. 3. Fragmente edilen DNA örneklerine ait temsili %1.5' luk agaroz jel görüntüsü 82	
Şekil 5. 4. GAPDH primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi	82
Şekil 5. 5. AlphaX1 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi	83
Şekil 5. 6. meDNA pozitif kontrol 1 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi	83
Şekil 5. 7. meDNA pozitif kontrol 2 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi	83
Şekil 5. 8. unDNA negatif kontrol 1 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi	84
Şekil 5. 9. unDNA negatif kontrol 2 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi	84
Şekil 5. 10. Tüm genom amplifikasyonu yapılan ve pürifiye edilen örneklere ait temsili % 1.5' luk agaroz jel görüntüsü	86
Şekil 5. 11. Arraylerden alınan sinyal gücü ve standart sapmalara ilişkin grafik	87
Şekil 5. 12. Arraylerden alınan sinyal gücü histogramı	88
Şekil 5. 13. Arrayle hibridize edilen Input örneklere ait ışımaya veren problemlerin temsili gösterimi	88
Şekil 5. 14. Arrayle hibridize edilen immünopresipite (IP) örneklere ait ışımaya veren problemlerin temsili gösterimi.....	88
Şekil 5. 15. Normalizasyon öncesi ve sonrasında bütün problemlerin ve kontrol problemlerinin yoğunluk grafikleri	90
Şekil 5. 16. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında en değişken 10^5 prob kullanılarak elde edilen çok boyutlu ölçekleme grafiği.....	93
Şekil 5. 17. Tedavi öncesi ve kontrol karşılaştırmasında en değişken 10^5 prob kullanılarak elde edilen çok boyutlu ölçekleme grafiği.....	93
Şekil 5. 18. Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında en değişken 10^5 prob kullanılarak elde edilen çok boyutlu ölçekleme grafiği.....	94
Şekil 5. 19. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında DMR olarak belirlenen 8. kromozomda bulunan bölgenin grafiksel gösterimi	94
Şekil 5. 20. Tedavi öncesi ve kontrol karşılaştırmasında DMR olarak belirlenen 9. kromozomda bulunan bölgenin grafiksel gösterimi	95
Şekil 5. 21. Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında DMR olarak belirlenen 3. kromozomda bulunan bölgenin grafiksel gösterimi	95
Şekil 5. 22. Karşılaştırmalarda öne çıkan yollardaki gen sayıları	107
Şekil 5. 23. İzole edilen RNA örneklerine ait temsili Agilent Bioanalyzer görüntüsü	112

Şekil 5. 24. Bağlı gen ifade oranlarının dağılımı.....	114
Şekil 5. 25. Tedavi öncesi ve sonrası her bir genin bağlı ifade oranlarının dağılımı	114
Şekil 6. 1. Doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksisite yolağı.....	119
Şekil 6. 2. Fokal adezyon yolağı	124
Şekil 6. 3. Kemokin sinyal yolağı	126
Şekil 6. 4. Tedavi öncesi örnekler ve kontrol karşılaştırmalarında ortak olan genlere ilişkin sayılar veriler	129

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Hematolojik malignitelerin sınıflandırılması (14).....	7
Çizelge 2. 2. Myelodisplastik sendroma ilişkin terminolojinin gelişimi (23).....	8
Çizelge 2. 3. MDS hastalarında kemik iliğinde görülen morfolojik anormallikler.....	11
Çizelge 2. 4. Fransız, Amerikan, İngiliz (FAB) sınıflandırması (34).....	12
Çizelge 2. 5. Dünya Sağlık Örgütü 2008 MDS sınıflandırması (38)	13
Çizelge 2. 6. Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (40)	14
Çizelge 2. 7. IPSS'e göre genel sağkalım ve lösemiye dönüşüm olasılığı (40)	15
Çizelge 2. 8. Revize edilmiş uluslararası prognostik sınıflama (41).....	15
Çizelge 2. 9. Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Skorlama Sistemi (WPSS) (42)	15
Çizelge 2. 10. MDS'de yaygın görülen sitogenetik değişimler ve sıklıkları.....	19
Çizelge 2. 11. MDS'de sık görülen gen mutasyonları.....	22
Çizelge 2. 12. MDS ve AML'de görülen gen mutasyonlarının epigenetik profil üzerine etkileri (111)	25
Çizelge 2. 13. Fransız, Amerikan, İngiliz (FAB) AML sınıflandırması	33
Çizelge 2. 14. Kanserde epigenetik olarak regüle edilen genler ve genlerin bulunduğu yollar (182, 188)	36
Çizelge 2. 15. MDS ve AML'de yaygın görülen hipermetile genler (111).....	37
Çizelge 3. 1. Tez çalışması ve mevcut literatürün karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4. 1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrollere ilişkin sayısal bilgiler... 58	
Çizelge 4. 2. qPCR'da kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon durumları	66
Çizelge 5. 1. DNA örneklerinin spektrofotometrik analiz sonuçları.....	78
Çizelge 5. 2. DNA örneklerine ait konsantrasyon sonuçları	79
Çizelge 5. 3. RNA örneklerinin spektrofotometrik analiz sonuçları	79
Çizelge 5. 4. RNA örneklerine ait konsantrasyon sonuçları.....	81
Çizelge 5. 5. QPCR' da elde edilen temsili Cp değerlerine ait sonuçlar	84
Çizelge 5. 6. İmmünopresipitasyondan elde edilen Ip ve Input örneklere ait temsili spektrofotometrik analiz sonuçları	85

Çizelge 5. 7. Tüm genom amplifikasyonu sonrası pürifiye edilen Ip ve Input örneklere ait temsili spektrofotometrik analiz sonuçları	86
Çizelge 5. 8. Kalite kontrol sonuçlarına göre analizden çıkarılan örneklere ait bilgiler	89
Çizelge 5. 9. Kalite kontrol sonrası analize devam edilen örnek sayısı	89
Çizelge 5. 10. Karşılaştırmalardan elde edilen farklı metilasyon gösteren bölgelere ilişkin sayısal veriler	91
Çizelge 5. 11. Karşılaştırmalar ve anotasyon küme sayıları.....	96
Çizelge 5. 12. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları	97
Çizelge 5. 13. Tedavi öncesi (eşli) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları	98
Çizelge 5. 14. Tedavi öncesi (tek) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları	100
Çizelge 5. 15. Tedavi öncesi tüm örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları	102
Çizelge 5. 16. Tedavi sonrası ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları.....	105
Çizelge 5. 17. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı	108
Çizelge 5. 18. Tedavi öncesi (eşli) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı	108
Çizelge 5. 19. Tedavi öncesi (tek) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı	109
Çizelge 5. 20. Tedavi öncesi (tüm örnekler) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı.....	110
Çizelge 5. 21. Tedavi sonrası ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı	111
Çizelge 5. 22. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında hipermetile bulunan genler	112
Çizelge 5. 23. Real time QRT-PCR’da kullanılan primerlerin efficiency değerleri	113
Çizelge 5. 24. Bağlı gen ifade değerlerinin tedavi öncesi tüm örnekler ve tedavi sonrası grup arasında istatistiksel anlamlılığı	115
Çizelge 5. 25. Bağlı gen ifade değerlerinin tedavi öncesi ve tedavi sonrası grup arasında istatistiksel anlamlılığı.....	116
Çizelge 6. 1. Real time çalışması için seçilen genler.....	131

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ALL	Akut lenfositik lösemi
AML	Akut myeloid lösemi
CDKN	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CR	Complete remission
DAPK	Death-associated protein kinase
ddH ₂ O	Deiyonize su
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EPO	Eritropoietin
ER	Estrogen receptor
FAB	Fransız, Amerikan, İngiliz grubu
FDA	Food and Drug Administration
GCSF	Granulocyte colony-stimulating factor
HAT	Histon asetiltransferaz
HDA	Histon deasetilaz
HIC1	Hypermethylated in cancer 1
HIF1	Hypoxia inducible factor
IDH 1	Isocitrate dehydrogenase 1
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	Revised International Prognostic Scoring System
KLL	Kronik lenfositik lösemi
KML	Kronik myeloid lösemi
KMML	Kronik myelomonositik lösemi
LMO2	Lim finger protein
MBD1	Methyl-CpG-binding domain protein 1
MBD2	Methyl-CpG-binding domain protein 2

MDS	Myelodisplastik sendrom
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
mg	Miligram
MNC	Mononükleer hücreler
MPN	Myeloproliferatif neoplasmalar
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI-PLC	Phosphoinositide-phospholipase C
RA	Refrakter anemi
RAEB	Blast artışı olan refrakter anemi
RAEB-T	Dönüşüm gösteren blast fazlası olan refrakter anemi
RARS	Ring sideroblastlı refrakter anemi
RCMD	Refractory cytopenia with multilineage dysplasia
RIZ1	Retinoblastoma protein-interacting zinc-finger 1
RNA	Ribonükleik asit
SCL/Tal	Stem cell leukemia hematopoietic transcription factor
SOCS	Suppressor of cytokine signaling-1
WHO	Dünya Sağlık Örgütü- World Health Organization
WPSS	World Health Organization Classification-based Prognostic Scoring System

1. GİRİŞ

Hem çocukluk çağında hem de yetişkinlikte önemli bir morbidite ve mortalite kaynağı olan lenfoma, myeloma ve lösemilerin oluşturduğu hematolojik maligniteler tüm kanserler içinde %9 oranında görülmektedir ve günümüzde insan sağlığını etkileyen önemli sorunlardan biridir. Türkiye kanser istatistikleri 2009 yılı verilerine göre ülkemizde 0-14 yaş grubundaki kız ve erkek çocuklarda en sık görülen (%32) çocukluk çağı kanseri lösemidir. Hematolojik malignitelerin görülme sıklığının fazla olmasının yanında yeni teşhis alan hasta sayısının da gün geçtikçe artması (kadınlar ve erkeklerde en sık teşhis alan kanserler içinde 4. sırada) bu hastalık grubuyla ilgili yapılan çalışmaların önemini ve gerekliliğini de ortaya koymaktadır (1).

Hematolojik malignite grubu hastalıkları içinde bulunan Myelodisplastik Sendrom'un (MDS) Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm yaş gruplarında görülme sıklığı 100.000'de 3-5' tir. Yetmiş yaş üstünde ise bu sıklık 100.000'de 22-45'e çıkmaktadır (2). Ülkemizde henüz MDS'nin epidemiyolojisi hakkında kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

MDS'nin kompleks ve heterojen doğasının yanında, olguların yaklaşık %50'sinde AML'ye dönüşüm görülmesi nedeniyle hastalık teşhisinin erken ve doğru yapılması ile hastalık alt tipinin belirlenmesi önemli bir noktadır. Bu bağlamda hastalıkla ilişkili moleküler değişimlerin tanımlanması ve karakterizasyonu gerek teşhiste gerekse prognozun belirlenmesinde yön gösterici olmakta, hasta spesifik ve hastalık ilişkili parametreler de değerlendirilerek uygun tedavi yaklaşımı seçilmektedir. Hastalığın ortaya çıkması, ilerlemesi ve nihayetinde AML'ye transforme olması sürecinin bütününde rol oynayan moleküler mekanizmanın tanımlanması, hastalığın prognozunun daha iyi anlaşılması ve hastanın hangi alt tipe dahil olduğunun net sınırlar çizilerek belirlenmesi neticesinde hastalıkla tam bir mücadele sağlanacak, en ideal tedavi protokolünün seçilmesi ve dolayısıyla en iyi sonucun alınabileceği gerçek manada iyileştirici yaklaşımların geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Bu çerçevede MDS hastalarında AML'ye dönüşüm sürecinin engellenmesi ile birlikte uygulanan tedaviden de daha etkin ve verimli sonuçlar alınması açısından hastalıkla ilişkili etkenlerin kromozomal anomaliler, genetik değişimler ve epigenetik deregülasyonlar

şeklinde stratifikasyonunun yapılması gerekmektedir. MDS'nin patogenezinin ait moleküler mekanizmanın aydınlatılması amacıyla yapılan araştırmalar ile hastalıkla ilişkili sitogenetik, genetik ve epigenetik düzeyde değişimler tespit edilmiştir. Hastalığın alt tipi, kemik iliğindeki blast oranı, hastanın klinik durumu ve kan tablosu gibi değişkenlere bağlı olarak belirlenen tedavi alternatifleri arasında kemoterapötikler, kök hücre transplantasyonu ve hipometile edici ilaçlar bulunmaktadır. MDS'de önemli bir epigenetik mekanizma olan DNA metilasyonunun etkin rol oynadığının anlaşılması ve mekanizmanın geri dönüştürülebilir işleyişe sahip olması sayesinde demetile edici özelliğe sahip 5-azasitidin'in hipometile edici ajan sıfatıyla tedavi protokolüne girmesi mümkün olmuştur. Farmakogenomik alanında yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yönelik önemli kazanımlar bulunmasının yanında epigenetik çalışmaların artırılmasıyla da hastalıkların altında yatan epigenetik mekanizmanın aydınlatılması, elde edilen verilerin kliniğe yansıtılması, yeni aday moleküler belirteçlerin tanımlanması ile moleküler anlamda bireysel hedeflenmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde temel oluşturması ümit edilmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

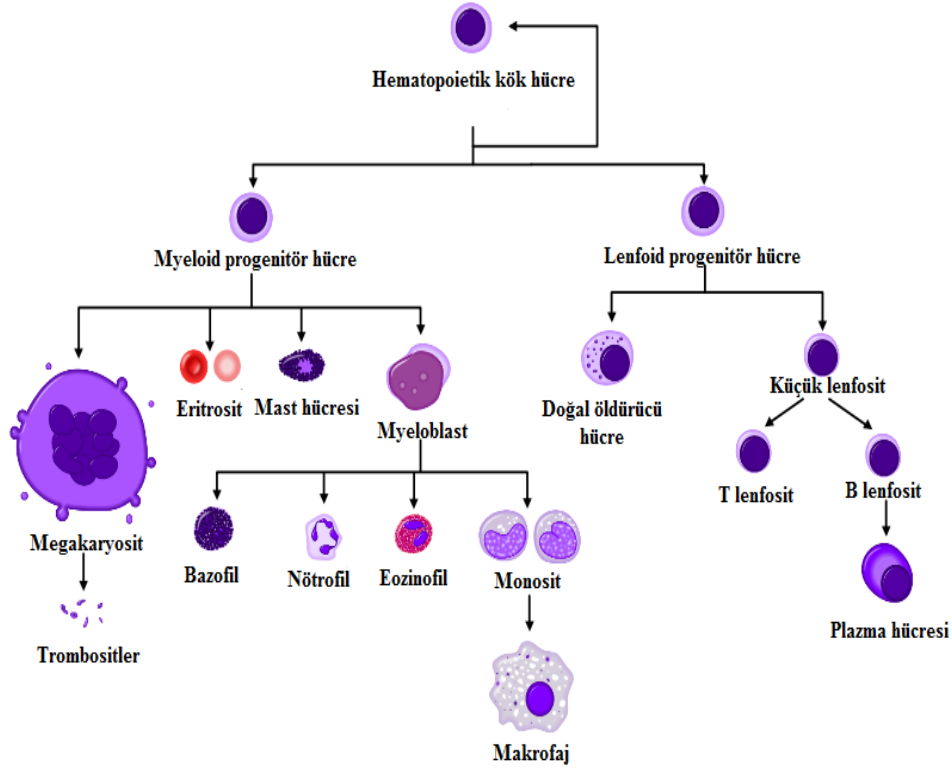
2.1. Hematopoiezis

Hematopoiezis, kemik iliğinde bulunan multipotent özellikteki hematopoietik kök hücrelerin farklılaşarak kanın tüm hücresel bileşenlerini oluşturmasıdır (3). Embriyonik ve yetişkin düzeyde gerçekleşen hematopoiezis sürecinde, hematopoietik kök hücreler (HSC, hematopoietic stem cell) gelişme, kendini yenileme ve farklılaşma özelliği göstermektedir (4). Embriyogenez ile başlayan hematopoietik kök hücre yapımı fetal karaciğer, timus ve kemik iliğinde devam etmektedir. Doğumdan itibaren tüm yaşam boyunca da kan hücrelerinin yapımı kemik iliğinde gerçekleşmektedir (5).

Hematopoietik kök hücreler ;

- Kemik iliğinde sürekli olarak kendilerini yenileyebilme
- Bölünme
- Koloni oluşturan üniteleri geliştirme
- Kanda bulunan değişik hücre tiplerine farklılaşabilme
- Özel şartlarda non-hematopoietik hücrelere farklılaşabilme (Plastisite)
- Kemik iliğinden dolaşıma geçebilme (mobilizasyon) veya tam tersi dolaşımdan kemik iliğine dönebilme (homing)
- Apoptozise gidebilme gibi özelliklere sahiptir.

Hematopoietik kök hücreler, farklılaşma özelliği gösteren ancak kendini yenileme kapasitesi olmayan myeloid ve lenfoid hücreleri oluşturmaktadır. Ardından myeloid öncü hücreler monosit, makrofaj, nötrofil, bazofil, eozinofil, eritrosit, megakaryosit/platelet, dendritik hücrelere farklılaşırken, lenfoid öncü hücreler ise T hücreleri, B hücreleri, NK hücrelerine farklılaşmaktadır (Şekil 2.1). Farklılaşma ve olgunlaşma süreci içerisinde hematopoietik kök hücrelerin yenilenme yetenekleri ve farklı serilere dönüşebilme potansiyelleri azalır. Oluşan bu hücreler değişik fonksiyonları yerine getirmek üzere özelleşmiş, olgun, çoğalmayan kısa ömürlü kan hücreleridir (6).



Şekil 2. 1. Hematopoietik kök hücre farklılaşması (7)

Hematopoietik büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri, interlökinler ve farklı sitokinlerin etkisi ile hematopoietik kök hücreler bölünme ve farklılaşmalarını gerçekleştirirler. Hematopoietik kök hücreler ve bunların farklılaşması ile oluşan progenitör hücreler trombosit yapımından sorumlu olan trombopoietin (TPO) ve eritroid progenitörlerin farklılaşarak olgun eritrositleri oluşturmasını sağlayan eritropoietin (Epo) gibi hematopoietik büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır (8).

Kök hücrelerin kendilerini yenileme ve bir hücre serisine yönelmelerinde o hücre serilerine özgül transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları önemlidir. Bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu çok karmaşık ve kompleks bir düzen içinde olmasına rağmen en büyük etken hematopoietik büyüme faktörleri şeklinde dış çevreden alınan düzenleyici sinyallerdir. Hematopoietik kök hücrelerin yaşamlarını sürdürmeleri, proliferasyonları, simetrik bölünme ve farklılaşmaları gibi fonksiyonları için aktif transkripsiyon faktörleri gereklidir. Erken hematopoietik gelişimde görevli önemli transkripsiyon faktörleri arasında ise SCL/Tal, RUNX-1, LMO2, AML-1 ve GATA-2 bulunmaktadır (9).

MDS bir hematopoietik kök hücre hastalığı olduğu için tez çalışmasında **CD34⁺**, **CD117⁺** ve **CD133⁺** hematopoietik kök hücreler kullanılmıştır. Bu nedenle hematopoietik hücrelerde bulunan hücre yüzey antijenleri ve özellikleri daha detaylı anlatılacaktır.

Hematopoietik kök hücreler, glikoprotein yapısında değişik hücre yüzey antijenleri taşımaktadır. Yüzeylerinde yer aldıkları hücrelerin tanımlanmasında kullanılan ve hücreleri birbirinden ayırt etmeyi sağlayan hücre yüzey antijenleri “Cluster of Differentiation, CD” terminolojisi ile ifade edilmektedir. Antijenlerin çoğu bir hücreye eşlik etmekle birlikte seriyeye özgünlük göstermemektedir. Hematopoietik kök hücreler üzerinde CD34 antijeni bulunurken CD38 antijeni bulunmamaktadır (CD34⁺ CD38⁻). Hücre farklılaşmasıyla değişkenlik gösteren antijenler, hücre olgunlaşmasının takibinde de kullanılabilir. Aynı zamanda bu antijenler lösemi ve lenfoma immünofenotiplemesinde, hematolojik tümörlerin belirlenmesinde, otoimmün hastalıkların tanısında ve kemoterapötik gözlemlenme aşamalarında kullanım açısından yararlı olmaktadır.

CD34: 90-110 kDa’luk glikoprotein yapısında bir antijendir. Hematopoietik kök hücreler ve vasküler endotelyumdan eksprese edildiği bilinmektedir. CD34 molekülü hücre-hücre adezyon faktörü olarak fonksiyon görmektedir (10).

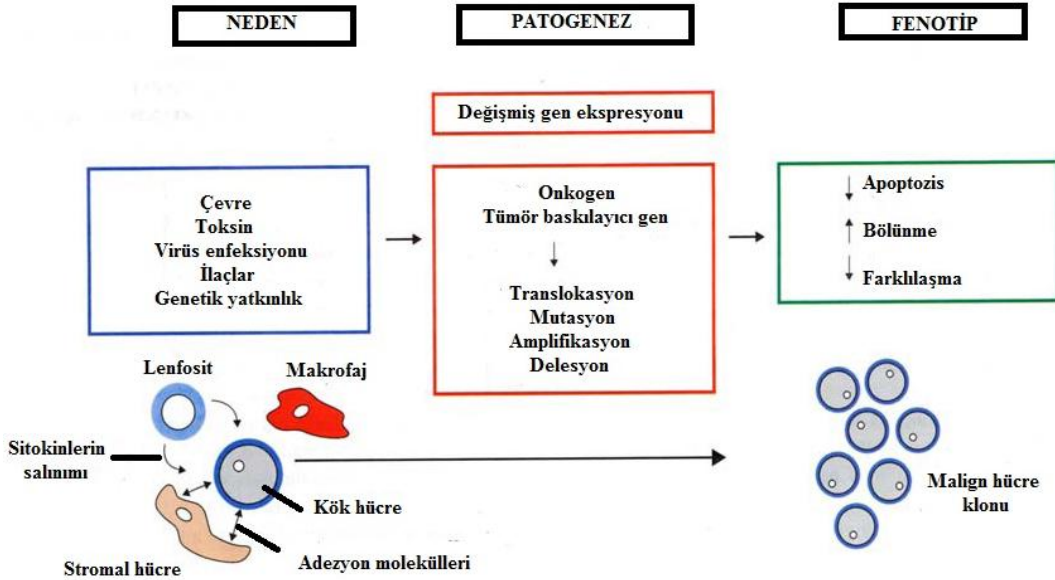
CD117: Mast/kök hücre büyüme faktörü reseptörüdür (SCFR). Reseptör tirozin kinaz c-kit, hematopoietik kök hücre, progenitor hücre ve birçok nonhematopoietik doku tarafından eksprese edilmektedir (11).

CD133: 115 kDa’luk hücre yüzey glikoproteinidir. Hematopoietik kök hücreler ve progenitor hücreler tarafından eksprese edilen AC133 olarak da bilinen glikoprotein yapıda hücre yüzey antijenidir (12).

2.2. Hematolojik Maligniteler

Sürekli ve dinamik bir süreç olan hematopoieziste yapım ve yıkım arasındaki dengenin kontrolü çok önemlidir. Kemik iliğinde meydana gelen hasar ve/veya değişimler, hücre döngüsünde rol oynayan onkogen ve tümör baskılayıcı genlerde oluşabilecek mutasyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler nedeniyle hematopoietik öncü hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasındaki düzenin bozulması hematopoiezisi ciddi şekilde etkilemekte ve

hematolojik malignitelere neden olmaktadır (13). Lösemilerin %50'sinde bu tür genetik değişimlerin hastalığın patogenezi ve prognozunda önemli birer belirteç niteliğinde olduğu bilinmektedir. Bu kapsamda öncelikle hematopoiezin bozulmasıyla ortaya çıkan hematolojik maligniteler ve daha sonra da bu hastalıklardan biri olan Myelodisplastik sendrom anlatılacaktır.



Şekil 2. 2. Hematolojik malignitelerin patogenezi (14)

Hematolojik maligniteler, kan, kemik iliği ve lenf nodlarını etkileyen kanser çeşitleridir ve temelde iki hücre serisinden köken alarak gelişirler. Lenfomalar, lenfositik lösemiler ve myeloma lenfoid seriden köken almaktadır. Akut ve kronik myeloid lösemi, myelodisplastik sendrom ve myeloproliferatif hastalıklar ise myeloid seriden kaynaklanmaktadır.

Bu gruptaki hastalıklar, sitolojik ve sitogenetik heterojeniteye sahip, değişik seviyelerde infektif hematopoiezin ve lösemik transformasyona hassasiyetin görüldüğü moleküler olarak farklı alt gruplardan oluşmaktadır. Genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan hematolojik malignitelerin sınıflandırılması Çizelge 2.1' de görülmektedir.

Çizelge 2. 1. Hematolojik malignitelerin sınıflandırılması (14)

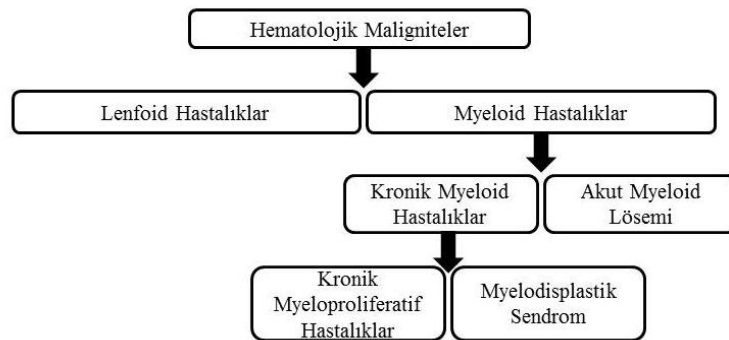
	Akut	Kronik
Lenfoid	Akut lenfoblastik lösemi (ALL) ve alt tipleri	Kronik lenfositik lösemi (KLL) Non-hodgkin lenfoma (NHL) Hodgkin lenfoma (HL) Multiple myeloma ve çeşitleri
Myeloid	Akut myeloid lösemi (AML) ve alt tipleri	Kronik myeloid lösemi (KML) ve çeşitleri Myelodisplastik sendrom (MDS) Myeloproliferatif hastalıklar

Tez çalışmasında, Myelodisplastik sendrom (MDS) ve MDS'den Akut myeloid lösemi'ye transforme olan hasta grubuyla çalışıldığı için ilgili hastalıklar ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

2.3. Myelodisplastik Sendrom

Hematopoietik bir kök hücre kendini yenileyebilme, farklılaşarak myeloid ya da lenfoid hücreye dönüşebilme özelliğine sahiptir. Hematopoietik kök hücreden köken alarak myeloid seriye farklılaşan hücrenin neoplastik transformasyonu sonucu myelodisplastik sendrom oluşmaktadır (15).

Myelodisplastik sendrom (MDS); hematopoiezinin bozulması ile ortaya çıkan, hücrel disfonksiyon ve hiperplastik kemik iliğine eşlik eden periferik kan sitopenisi (değişen derece ve kombinasyonlarda anemi, nötropeni ve/veya trombositopeni) ile karakterize ve akut myeloid lösemi'ye (AML) dönüşme riski yüksek olan heterojen özellik gösteren klonal bir hastalıktır (16-19). Belirli alt tiplere göre değişmekle birlikte, MDS hastalarında ortalama hayatta kalım yaklaşık 0.5- 6 yıldır (20, 21).



Şekil 2. 3. MDS'nin hematolojik malignitelerdeki yeri

2.3.1.Tarihçe ve Epidemiyoloji

Başlangıçta bir anemi formu olarak değerlendirilen MDS için ilk kez 1907’de Luzatto “pseudoaplastik anemi” terimini kullanmıştır. 1938 yılında 100 anemili hasta “refrakter anemi (RA)” olarak tanımlanmıştır. Hamilton-Paterson bu ve buna benzer hastaları değerlendirerek akut lösemi gelişen bir grup refrakter anemili hasta için “prelösemik anemi” terimini kullanmıştır. 1953’te Block ve arkadaşları bu terimi çoklu seri sitopenileri de ekleyerek genişletmiştir. 1956’da ise Bjorkman ring sideroplastlı refrakter aneminin klinik özelliklerini tanımlamıştır (22). Bu grubu oluşturan hastalıklar üzerine yapılan çalışmalar ve hastalara ait klinik profilin değerlendirilmesiyle elde edilen bilgiler ışığında günümüze kadar bu tip hastalıkları tanımlamak için kullanılan değişik kavramlar Çizelge 2.2.’de özetlenmektedir.

Fransız, Amerikan İngiliz çalışma grubu tarafından lösemiler için önerilen ve MDS’yi kapsayan ilk sınıflandırma 1976 yılında yapılmış, yine aynı grup 1982’de bu sınıflandırmayı revize etmiştir. Dünya sağlık örgütü MDS sınıflandırması 2000 yılında geliştirilmiş ve 2008 yılında yeniden düzenlenmiştir.

Çizelge 2. 2. Myelodisplastik sendroma ilişkin terminolojinin gelişimi (23)

Yayın yılı	İsim
1907	Pseudoaplastik anemi
1938	Refrakter anemi
1949	Prelösemik anemi
1953	Prelösemi
1956	Ringed sideroplastlı refrakter anemi
1959	Refrakter normoplastik anemi
1963	Smoldering akut lösemi
1969	Kronik eritemik myelosis
1973	Prelösemik sendrom
1974	Subakut myelomonositik lösemi
1974	Kronik myelomonositik lösemi
1975	Hipoplastik akut myelogenik lösemi
1976	Artmış myeloplastlı refrakter anemi
1978	Hematopoietik displazi
1979	Subakut myeloid lösemi
1980	Dismyelopoietik lösemi
1982	Myelodisplastik sendrom

Myelodisplastik sendrom gibi hematopoiezisin klonal bozukluklarında hematopoietik kök hücrelerle birlikte progenitör hücrelerin de etkilenmesi hem çocuklarda hem de yetişkinlerde ciddi sağlık problemlerine yol açmaktadır. MDS ileri yaş hastalığı olarak

bilinmekle beraber genç yaştaki bireylerde de görülmektedir (24). MDS'nin insidansı 8-12/100.000'dir. 60 yaş üstünde ve özellikle yeni teşhis edilen hastalarda yaş ortalamasının 65 olması nedeniyle MDS bu yaş grubunda en sık görülen hematolojik malignite olarak nitelendirilmektedir (25). ABD'de yıllık yaklaşık 15000 vakaya MDS teşhisi konulmaktadır. 2030 yılına kadar 65 yaşın üstündeki bireylerde bu sayının ikiye katlaması beklenmektedir (26). Ülkemizde hastalığın görülme sıklığını belirleyecek kapsamlı epidemiyolojik veri bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm yaş gruplarında sıklığın 3-5/100.000 olduğu tespit edilmiştir. Batı ülkelerinde de yaygın görülen hematolojik malignitelerden biri olan MDS'nin 70 yaş üstünde görülme sıklığı 20-45/100000'dir ve bu sayı yaşın ilerlemesiyle artış göstermektedir (27, 28). Gerçek prevalansın rapor edilenden çok daha fazla olduğu düşünülmektedir (23).

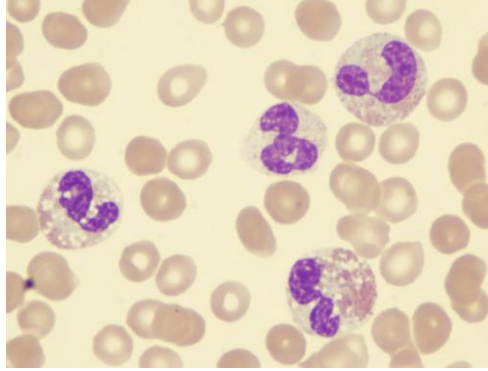
2.3.2. Klinik ve Morfolojik Özellikler

MDS'de klinik özellikler, alt gruplar ve bireyler arasında büyük farklılık göstermektedir. Hastalarda genellikle kemik iliği yetmezliğinden kaynaklanan periferik sitopeniler (trombositopeni, nötropeni ve anemi) görülmektedir. Teşhiste hastaların büyük kısmında değişik derecelerde ve genellikle de ciddi anemi varlığı tespit edilmektedir (29). Anemi ilişkili semptomlar (yorgunluk, solunum güçlüğü, kalp yetmezliği) MDS'de en yaygın görülen klinik özellikleri oluşturmaktadır. Diğer sık görülen semptomlar trombositopeni ve platelet disfonksiyonundan kaynaklanan kanama ve nötropeniye bağlı olarak gelişen enfeksiyon komplikasyonlarıdır. Kanama ve enfeksiyon MDS'de ölüme neden olan temel sebepler arasındadır.

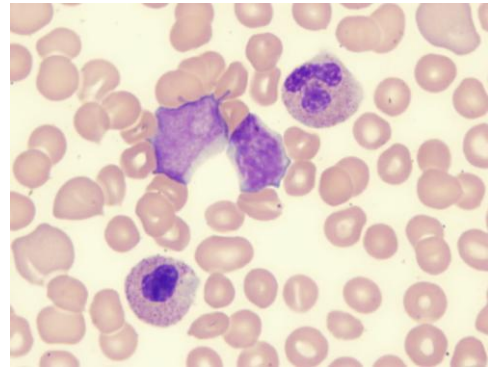
MDS'de megaloblastoid değişimli hiperselüler kemik iliği (atipik megakaryositler), eritroid hiperplazi, myeloid seride bozuk maturasyon, artmış blastlar ve ring sideroblastlar (bazı hastalarda) gibi morfolojik özellikler görülmektedir. MDS olgularının çoğunda kemik iliği hiperselüler olmakla birlikte hiposelüler veya normoselüler ilik de bulunabilmektedir.

Hücrelerde diseritropoiezis, disgranülopoiezis ve dismegakaryopoiezis gibi değişik özelliklerde displazi olarak tanımlanan morfolojik anormallikler görülmektedir (Çizelge 2.3). MDS ilişkili displazinin doğru teşhisi periferik kanla birlikte kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisinin incelenmesini gerektirmektedir. Myeloblastların yüzdesini belirlemek için

yapılan morfolojik analizler aynı zamanda kan veya kemik iliğinde oluşabilecek sitolojik spesifik anormalliklerin tanımlanmasını da sağlamaktadır.



Şekil 2. 4. MDS’de displastik eozinofil, anormal hipogranülasyon (30)



Şekil 2. 5. MDS’de blast ve monoloblu nötrofil (30)

MDS’de teşhis stratejisi periferik kan yayması ve kemik iliği aspirat morfolojisiyle birlikte Dünya Sağlık Örgütü’nün belirlemiş olduğu sınıflandırma şeması dikkate alınarak yapılmaktadır. MDS tanısı konabilmesi için gerekli minimum tanı kriterleri aşağıdaki gibidir (31).

1. Devamlı ve nedeni açıklanamayan nötropeni, trombositopeni veya anemi
2. Kemik iliğinde en az bir seride hücrelerin normalden farklılık göstermesi (displazi)
3. Hematopoietik kök hücrede sitogenetik anomaliler
4. Kemik iliğinde artmış blast sayısı (%5)
5. MDS ilişkili kriterler
6. Tipik karyotip anomalileri
7. Ring sideroblast \geq %15

Çizelge 2. 3. MDS hastalarında kemik iliğinde görülen morfolojik anormallikler

Diseritropoiezis	Disgranülopoiezis	Distrombopoiezis
Anisositozis	Pelger-Huët benzeri anomali	Büyük plateletler
Poikilositozis	Degranülasyon	Hipogranülasyon
Makrositozis	Hipersegmentasyon	Hipergranülasyon
Basofilik stippling	Nüklear çubuklar	
Çok çekirdekli hücre	Döhle cisimcikleri	

2.3.3. Sınıflandırma

Fransız, Amerikan, İngiliz (FAB) çalışma grubu 1976'da hematopoiezin defektif oluşunu, periferik kan ve kemik iliğinde olgunlaşan kan hücrelerinin morfolojik bozukluklarını tanımlamak için displazi terimini kullanmıştır. MDS'nin morfolojik sınıflaması ilk kez FAB grubu tarafından yapılmış olup iki aşamalı olarak teklif edilmiştir. Önce 1976'da MDS ve AML'yi birbirinden ayırt edecek kriterler tanımlanarak bunların yinelenebilirliği gösterilmiş (32) ardından 1982'de MDS daha sabit seyirli düşük riskli ya da kemik iliği yetersizliği veya AML'ye daha hızlı ilerleyen yüksek riskli alt tiplere ayrılmıştır (33)

Periferik kandaki ve/veya kemik iliğindeki blast hücre yüzdesinin temel ayırım özelliklerinden biri olarak kullanıldığı sınıflandırmada, monosit sayısı ve ring sideroblast yüzdesi de kullanılan parametreler arasındadır. FAB sınıflandırmasında beş alt grup tanımlanmıştır. Bunlar:

- a. Refrakter anemi (RA)
- b. Ring sideroblastlı refrakter anemi (RARS)
- c. Blast artışı olan refrakter anemi (RAEB)
- d. Dönüşüm gösteren blast fazlası olan refrakter anemi (RAEB-T)
- e. Kronik myelomonositik lösemi (KMML) şeklindedir.

FAB sınıflandırılmasında blast oranı olarak %5, %20 ve %29 değerleri esas alınmıştır. Blast oranı %5'in altında olan olgular RA ve RARS olarak sınıflandırılmıştır. %5-20 arasında olan hastalar ise RAEB olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 2. 4. Fransız, Amerikan, İngiliz (FAB) sınıflandırması (34)

Tip	Sıklık (%)	Blast (%)	AML'ye transformasyon	Diğer
RA	10-40	<5	10-20	
RARS	10-20	<5	10	>%15 RS
RAEB	25-30	5-20	40-50	>10 ⁹ monosit
KMML	10-20	≤20	20	
RAEB-T	10-30			

AML: Akut myeloid lösemi, KMML: Kronik myelomonositik lösemi, RA: Refrakter anemi, RARS: Ringed sideroblastlı refrakter anemi, RAEB: Blast artışı olan refrakter anemi, RAEB-T: Dönüşüm gösteren blast fazlası olan refrakter anemi,

Sadece morfolojik özelliklerin temel alındığı, klinik parametreleri içermeyen FAB sınıflandırması 1982 ve 1985 yıllarında gözden geçirilerek yeniden düzenlenmiştir (33). İlk yapılan sınıflandırmada RAEB olgularındaki blast yüzdesi için geniş bir aralık (%5-20) verilirken yapılan çalışmalarla %10 blast oranı eşik değer kabul edilerek prognoz ve lösemik transformasyon açısından farklılık gösteren RAEB hastaları iki gruba ayrılmıştır. Eşik değer altındaki olgular RAEB-1 ve üstündekiler ise RAEB-2 olarak tanımlanmıştır.

1997 yılına kadar FAB sınıflaması kabul görerek kullanılmıştır ancak zaman içinde sitogenetik analizlerin prognostik öneminin daha iyi belirlenmesi, RA ve RARS grubundaki hastaların klinik seyirlerinin heterojen olması, KMML'nin myelodisplazi mi ya da myeloproliferatif hastalıklar grubunda mı yer alması gerektiğinin tartışılması, sekonder MDS gibi tanımlamaların sınıflandırmada yer almaması FAB sınıflamasının yetersiz kaldığı noktalar olarak kabul edilmiştir. Bu tespitler temel alınarak MDS sınıflandırması Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yeniden ele alınarak geliştirilmiştir (35). Bu sahada çalışan grupların eleştirisi ve önerileri doğrultusunda, genetik özellikler de göz önünde bulundurularak yapılan sınıflandırma 2008 yılında güncellenmiştir (36, 37). Buna göre;

- Refrakter anemi (RA)
- Ringed sideroblastlı refrakter anemi (RARS)
- Çok hücre dizili displazi ile refrakter sitopeni ve ringed sideroblast (RCMD-RS)
- Blast fazlalığı olan refrakter anemi 1 (RAEB-1)
- Blast fazlalığı olan refrakter anemi 2 (RAEB-2)
- MDS-5q sendromu
- Sınıflandırılmayan MDS (MDS-U) şeklinde gruplandırılmıştır.

Çizelge 2. 5. Dünya Sağlık Örgütü 2008 MDS sınıflandırması (38)

Alt tip	Çevre Kanı	Kemik İliği
Tek dizide displazi ile seyreden refrakter sitopeniler (RCUD)		
Refrakter anemi (RA)	Anemi, Blast <% 1	Eritroid displazi (hücre >% 10) blast <% 5
Refrakter nötropeni (RN)	Nötropeni, Blast <% 1	Granülositik displazi blast <% 5
Refrakter trombositopeni (RT)	Trombositopeni, Blast <% 1	Megakaryositik displazi blast <% 5
Ringed sideroblastlı refrakter anemi (RARS)	Anemi, blast yok	Sadece eritroid displazi Ring sideroblast≥%15 blast <% 5
Çoklu dizide displazili refrakter sitopeni (RCMD)	Sitopeni (1er) Blast<% 1 Auer cisimciği yok	Çoklu dizide displazi +/- ring sideroblasts blast <% 5 Auer cisimciği yok
Blast fazlalığı olan refrakter anemi 1 (RAEB-1)	Sitopeni (1er) Blast<% 2-9 Auer cisimciği yok	Tek veya çoklu dizide displazi %5-9 blast Auer cisimciği yok
Blast fazlalığı olan refrakter anemi 2 (RAEB-2)	Sitopeni (1er) Blast<% 5-19 +/- Auer cisimciği	Tek veya çoklu dizide displazi % 10-19 blast +/- Auer cisimciği
MDS-5q sendromu	Anemi Normal/artmış trombosit sayısı Blast<% 1	5q31 delesyonu Anemi, Hipolobule normal veya artmış megakaryosit blast <% 5
Sınıflandırılmayan MDS (MDS-U)	Sitopeni Blast<% 1	
Çocukluk çağı MDS	Pansitopeni	blast <% 5

2.3.4. Prognoz

MDS'nin doğal seyri çok değişken olup kronik ve yavaş seyreden bir prognozdan hızlı lösemik ilerleme gösteren bir prognoza kadar uzanabilmektedir. Hastalıkta daha etkin teşhis ve tedavi sağlanması amacıyla gerek FAB (French-American-British) gerekse WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından geliştirilen sınıflandırmalarla MDS hastaları efektif şekilde kategorize edilebiliyor olsa da MDS'ye ilişkin prognozun öngörülmesinde kısıtlamalar bulunmakta ve tam anlamıyla başarı sağlanamamaktadır. Greenberg ve arkadaşlarına göre bu kısıtlamalar kemik iliği blast yüzdesi geniş bir aralıkta belirtilen RAEB ve KMML alt gruplarını da etkilemektedir. Sitogenetik, sitopeniyle ilişkili morbiditelerin sayısı ve derecesi gibi kritik biyolojik belirleyicilerin eksikliği de vurgulanmaktadır. Bu kısıtlamalar yeni risk bazlı sınıflandırmaların geliştirilmesinin gerekliliğini göstermiştir (39). MDS vakalarının her birinin değişkenlik gösteren süreçleri incelenerek hayatta kalım ve lösemiye dönüşümün tahmin edilebilmesi amacıyla değişik

prognostik skorlama sistemleri geliştirilmiştir (40). Bunların içinde en yaygın olarak kullanılanları IPSS (Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi) (Çizelge 2.6) ile WPSS (Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Skorlama Sistemi) (Çizelge 2.7) sistemleridir.

MDS, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflama sisteminde kemik iliğindeki blast hücre yüzdesine göre düşük ve yüksek risk olmak üzere sınıflandırılmaktadır. İyi yapılandırılmış olan uluslararası prognostik skorlama sisteminde ise MDS hastaları sitogenetik profil, sitopeni durumu ve kemik iliğindeki blast yüzdesi baz alınarak (Çizelge 2.6) farklı prognozlara göre dört risk kategorinde sınıflandırılmıştır. Düşük risk grubu IPSS'e göre düşük risk ve orta I risk grubundan oluşurken, yüksek risk grubu IPSS'e göre orta II risk ve yüksek risk grubundan oluşmaktadır.

Düşük Risk Grubu

- IPSS'ye göre düşük risk
- IPSS'ye göre orta-1 risk

Yüksek Risk Grubu

- IPSS'ye göre orta-2 risk
- IPSS'ye göre yüksek risk

Çizelge 2. 6. Uluslararası Prognostik Skorlama Sistemi (40)

	Skor değeri				
Prognostik değişken	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			

¹**İyi:** Normal, -Y, del(5q), del (20q). **Kötü:** Kompleks (≥ 3 anomali) veya kromozom 7 anomalileri. **Orta:** diğer anomaliler

²Hemoglobin <10 gr/dL, mutlak nötrofil sayısı: <1.8x10⁹/L, trombosit<100x10⁹/L

Yeni teşhis hasta prognozunun değerlendirilmesinde önemli bir standart olan Uluslararası prognostik skorlama sistemi daha fazla sayıda hastadan alınan verinin kombine edilmesi ile yenilenmiştir. Kemik iliği sitogenetiği, kemik iliği blast yüzdesi ve sitopeniler yeni sistemin temelini oluşturmaya devam ederken 5 temel prognostik kategori tanımlanmıştır.

Çizelge 2. 7. IPSS'e göre genel sağkalım ve lösemiye dönüşüm olasılığı (40)

IPSS risk kategorisi	Skor	Ortalama hayatta kalım (yıl)	% 25 AML'ye dönüşüm için geçen süre
Düşük	0	5.7	9.4
Orta-1	0.5-1	3.5	0.2
Orta-2	1-1.5	1.1	3.3
Yüksek	≥2.5	0.4	1.1

MDS'de hayatta kalım için prognostik öneme sahip olduğu gösterilen serum laktat dehidrogenaz, ferritin ve β_2 -mikroglobulin gibi parametreler yanında hastanın yaşı ve performans durumu da dikkate alınarak gruplandırma yapılmıştır (41).

Çizelge 2. 8. Revize edilmiş uluslararası prognostik sınıflama (41)

Prognostik değişken	IPSS-R prognostik skor değerleri (%)						
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Sitogenetik*	çok iyi		İyi		Orta	kötü	çok kötü
Kemik iliği blast yüzdesi	≤2		>2-<5		5-10	>10	
Hemoglobin	≥10		8-<10	<8			
Plateletler	≥100	50-<100	<50				
Nötrofil sayısı	≥0.8	<0.8					

*Sitogenetik prognostik alt gruplar: çok iyi [-Y, del(11q)]; iyi [normal, del(5q), del(12p), del(20q), double including del(5q)]; orta [del(7q), +8, +19, i(17q), daha başka tek veya çift bağımsız klonlar]; kötü [-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), double including -7/del(7q), kompleks: 3 anomali]; çok kötü (kompleks: >3 anomali).

Çizelge 2. 9. Dünya Sağlık Örgütü Prognostik Skorlama Sistemi (WPSS) (42)

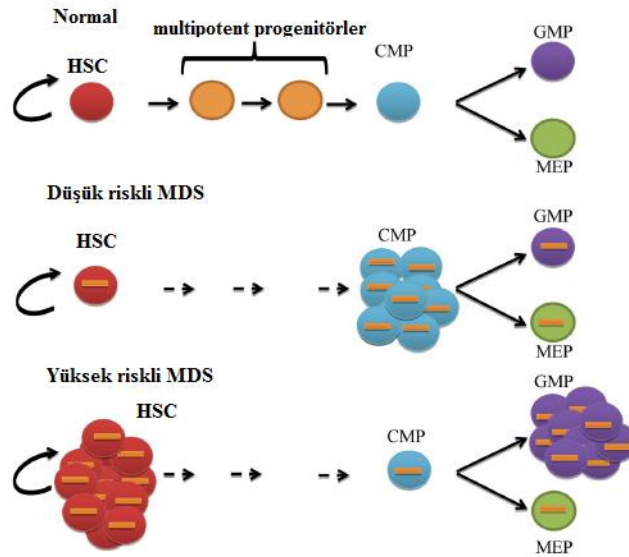
Değişken	0	1	2	3
Dünya Sağlık Örgütü sınıflaması	RA, RARS, 5q-	RCMD, RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2
Karyotip ¹	İyi	Orta	Kötü	-
Transfüzyon ihtiyacı ²	Yok	Düzenli	-	-

¹İyi: Normal, -Y, del(5q), del (20q). **Kötü:** Kompleks (≥3 anomali) veya kromozom 7 anomalileri. **Orta:** diğer anomaliler, ² 4 aylık süre içerisinde her 8 haftada en az bir eritrosit transfüzyonu

2.3.5. Etyoloji ve Patogenez

Myelodisplastik sendrom, biyolojik ve klinik olarak heterojen, klonal hematopoietik neoplazmların oluşturduğu kompleks bir hastalık olduğu için hastalığın etyolojisi ve patogenezini tam olarak anlayamamıştır. Hematopoietik kök hücreler/hematopoietik öncüllerin, kemik iliği mikroçevresinin ve bu bileşenlerin karmaşık interaksyonunu kapsayan kompleks bir patogeneze sahip MDS'de görülen temel özellikler arasında klonal gelişim, anormal myeloid farklılaşma, inefektif hematopoiezis, hücrel maturasyonun azalması, displastik değişimler, artmış genomik instabilite ve değişen oranlarda lösemik progresyon sayılabilmektedir (43, 44).

Hematopoietik kök hücre bozukluğu olarak tanımlanan MDS’de progenitör hücrelerde kromozomal anomaliler, mutasyonlar ve epigenetik değişimler tespit edilmiştir. Bununla birlikte hastalığın ilk aşamasında gerçekleşen moleküler ve patolojik olaylar ve bunların fonksiyonel sonuçları henüz tam anlamıyla belirlenmiş değildir. Will ve arkadaşları’nın primitif ve progenitör hücreleri kullanarak yaptıkları çalışmalarında MDS alt tipleri ve sağlıklı kontrollerde kıyaslanan hematopoietik kök hücre sayısının yüksek riskli MDS alt tiplerinde artmış olduğu gösterilmiştir. Düşük riskli MDS’de myeloid progenitör hücrelerin (CMP) sayısında artış görülürken, yüksek riskli MDS’de granülosit-monosit progenitörlerin (GMP) sayısında artışla birlikte megakaryosit-eritrosit progenitör (MEP) hücre popülasyonunda azalma tespit edilmiştir. Farklı hücre popülasyonlarındaki bu sayısal değişim aynı zamanda AML’de de görülmüştür (45).



Şekil 2. 6. MDS’de hematopoietik kök hücre ve progenitör hücre popülasyonunda görülen sayısal farklılıklar (46)

MDS’de kalıtsal ve çevresel faktörler neoplastik transformasyonda etkili olmaktadır. MDS vakalarının yaklaşık %90’unda hastalık de novo gelişmektedir ve nedeni tanımlanamamaktadır. Kalan %10’luk bir kısımda ise kemoterapi ve/veya ışın kaynaklı hastalık gelişimi görülmektedir. MDS insidansı genotoksinlere (iyonize radyasyon, alkilatör kemoterapi) maruz kalan bireylerde veya yatkınlık kazandıran genetik varyasyonları kalıtlanmış kişilerde artış göstermektedir. MDS gelişimi için potansiyel çevresel risk faktörleri arasında sigara kullanımı, iyonize radyasyon, organik kimyasallar (benzen, toluen, ksilen gibi), ağır metaller, herbisitler ve pestisitler bulunurken, onkojenik virüs enfeksiyonu ve mesleki faktörler de hastalık oluşumunu tetiklemektedir (47, 48).

MDS, oluşum bakımından “primer” (veya de novo) ve “tedavi ilişkili” (radyoterapi veya kemoterapi sonrası gelişen) olarak sınıflandırılmaktadır. MDS’de tedavi amacıyla kullanılan bazı alkilleyici ajanlar ve bazı hastalıklarda verilen yüksek doz radyoterapi sekonder MDS’ye yol açmaktadır. Sekonder MDS ve de novo MDS de kazanılmış genetik lezyon spektrumu benzer olmasına rağmen mutasyonel sıklıklar farklıdır. Örneğin, TP53 mutasyonları de novo MDS’de nispeten seyrek iken, terapi ilişkili MDS’de daha yaygın (%25-30) görülmektedir (49). RUNX1 ve N/KRAS mutasyonları da terapi ilişkili MDS’de de novo MDS’den daha yaygındır. Dengeli translokasyonlar ise de novo MDS’de nadiren görülürken radyasyon ile indüklenmiş MDS’de daha yaygındır (50).

Programlı hücre ölümü olarak tanımlanan, intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptörleri) olmak üzere iki farklı biyokimyasal yolakla meydana gelen apoptozis MDS patogenezinde önemli bir yer tutmaktadır (51-53). Apoptozis, morfolojik ve biyokimyasal değişimlerle karakterize, hücre proteinlerin ve nükleik asitlerin fragmentasyonunu kapsayan, hücre büyümesi ve ölümü arasındaki homeostatik dengenin sürdürülmesini sağlayan hücrel bir prosestir (54). Hematopoietik kök hücrelerde apoptoziste görülen önemli artış hiperselüler ilik ve periferik kanda sitopeniye neden olan mekanizmalardan biri olarak görülmektedir (55). Kemik iliği mikroçevresinin de rol oynadığı MDS gelişimi ve progresyonunda sitokin seviyesi ve apoptozis oranlarında değişim olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir (56). Erken evre MDS’de CD34⁺ progenitörlerde artmış apoptozis görülürken, hastalığın ilerleyen aşamalarında bu durum tersine dönmektedir. MDS’den AML’ye progresyonda bu mekanizmanın nasıl işlediği tam anlaşılmamış olsa da proliferatif genetik olayları da kapsayan ek faktörlerin daha önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (57, 58). Düşük riskli MDS alt tiplerinden olan ring sideroblastlı refrakter anemi (RARS) ve çoklu dizide displazili refrakter sitopeni (RCMD)’de hem intrinsik hem de ekstrinsik yollar aracılığıyla artmış apoptozis görülmektedir. RA ve RARS alt tiplerindeki artmış apoptozis değişik derecelerde sitopeniye neden olmakta, bu durum hastalarda sitokin tedavisiyle düzeltilmektedir (59).

Sitokin seviyesi ve hematopoietik farklılaşma derecesine bağlı olarak baskılanan veya indüklenen apoptozis süreci TNF- α , interlökin-1 β , TGF β (transforming growth factor) gibi sitokinler tarafından regüle edilmektedir. Hematopoiezisin negatif regülatörleri olan TNF- α , Fas ligand ve TRAIL’in fazla ekspresyonu apoptozis ve hematopoietik yetersizliğe neden olan temel faktör olarak görünmektedir. Tümör nekrozis faktör (TNF- α), Fas-ligand,

TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ve diğer proapoptotik sitokinlerin erken evre/düşük riskli MDS'de ekspresyonunda artış olmaktadır (60, 61). TRAIL klonal hücrelerde apoptozisi indükleyerek klonu kısıtlamaktadır. FAS, normal kemik iliğinden eksprese olmamasına karşın erken MDS kemik iliğinin %40'ında ekspresyonu artmıştır ve fonksiyoneldir. MDS hastalarında kemik iliği fibroblast ve makrofajlarının normalden fazla salgıladıkları TNF ve interlökin-6 apoptozisin artmasına neden olmaktadır (62).

Hematopoietik kök hücrelerin klonal olarak bozukluk gösterdiği heterojen bir hastalık olan MDS'de, normal bir kök hücrenin önce prelösemik daha sonra da lösemik bir hücreye transforme olabildiği gözlenen bir süreç yaşanmaktadır. Myelodisplastik sendromun sitogenetik, genetik ve epigenetik seviyede değişimlerin gerçekleştiği çok basamaklı bir değişim birikimi sonucunda oluştuğu bilinmektedir (49, 63). İlerleyen başlıklar altında bugüne dek yapılan çalışmalar kapsamında hastalıkla ilişkilendirilen bu değişimler ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

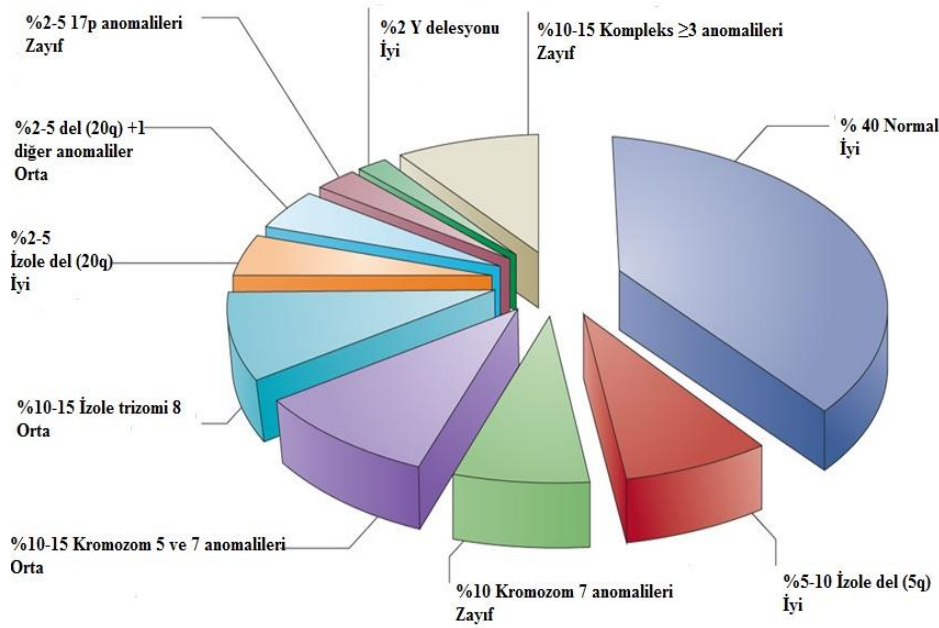
2.3.5.1. Sitogenetik Değişimler

MDS karakterizasyonunda hastalığın moleküler patogeneze dair önemli ipuçları sağlamaları açısından sitogenetik analizler büyük önem taşımaktadır. Hastaların %70'inden fazlası sitogenetik anomalilere sahiptir ve bu bağlamda sitogenetik çalışmalar, primer MDS ve tedavi ilişkili MDS kavramlarının açıklanmasında, teşhis konulmasında, hayatta kalım için prognoz ve AML'ye transformasyonun değerlendirilmesinde merkezi bir rol oynamaktadır.

MDS hastalarında üç veya daha fazla sitogenetik anomalinin bulunması "**kompleks karyotip**" olarak tanımlanmaktadır. Bu durum kötü prognoz ve hastalığın daha agresif olmasıyla ilişkilendirilmektedir (64). Anormal karyotip kompleksliği tedavi ilişkili MDS'de primer MDS'den daha yaygın görülmektedir (65, 66). MDS'de yaygın görülen sitogenetik değişimler ve sıklıkları Çizelge 2.10'da özetlenmiştir (67, 68).

Çizelge 2. 10. MDS’de yaygın görülen sitogenetik değişimler ve sıklıkları

MDS alt tipi	Sıklık	Kromozomal aberasyonlar
RA	%25	del(5q), del(20q), -Y, -7, +8
RARS	%10	del(5q), del(20q), -Y, -7, +8, idic(X)(q13)
RCMD	%50	del(5q), -7, +8
RCMD-RS	%50	del(5q), -7, +8
RAEB-1	%50	del(5q), -7, +8, del(20q)
RAEB-2	%50-75	del(5q), -7, +8, -17p, del(11q), t(11q23), -13, del(13q)
MDS del(5q)	%100	del(5q)



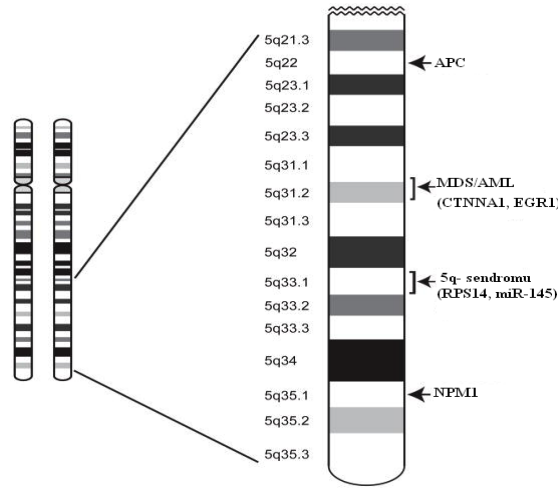
Şekil 2. 7. Myelodisplastik sendrom’da fenotipik heterojenitenin genetik temeli (69)

- **Kromozomal Delesyonlar**

Kromozomal delesyonlar, myeloid malignitelerde yaygın görülen moleküler değişimlerdir. Heterozigot delesyonlar homozigot inaktivasyona neden olan bir tümör baskılayıcı geni ya da hastalık fenotipinin değişimine neden olan bir veya daha fazla sayıda geni içerebilir (70).

5q- : MDS hastalarının %20’den fazlasında ve en yaygın da refrakter anemide görülmektedir (71). 5q- sendromu olarak tanımlanan bu hematolojik fenotipte ciddi makrositik anemi, normal veya azalmış nötrofil sayısı, hipoloblu mikromegakaryositle

birlikte normal veya artmış platelet sayısı görülmektedir ve diğer alt tiplerle kıyaslandığında AML'ye dönüşüm düşük orandadır (72-74).



Şekil 2. 8. Kromozom 5'te delesyonun yaygın görüldüğü bölgeler ve önemli genler (75)

5. kromozomda sıklıkla delesyon görülen iki bölge rapor edilmiştir. Bunlar 5q52–33 ve 5q31'dir. 5q-sendromlu hastaların çoğunda her iki delesyon da görülmektedir ve bu bölgelerde bulunan kritik genler açısından delesyonlar önemlidir (76, 77). 5. kromozomda delesyonun yaygın görüldüğü bölgeler ve burada bulunan genler Şekil 2.8'de görülmektedir. 5. kromozomun uzun kolunda oluşan delesyonlar ya tek başına ya da diğer kromozomal aberasyonlarla birlikte ve sıklıkla da kompleks karyotiple birlikte oluşmaktadır. İzole 5q delesyonu iyi prognozla ilişkilidir (78). AML'ye transformasyon ve hayatta kalım ek kromozomal anomalilerin varlığına bağlı olarak değişmektedir (79).

Monozomi 7: Çocukluk çağı MDS'de en sık görülen kromozomal aberasyondur (80). Agresif hastalık progresyonu ve kısa hayatta kalım ile ilişkilidir (81, 82)

Trizomi 8: MDS ve AML'de en sık görülen trizomidir (83).

20q-: 20q delesyonu MDS hastalarının yaklaşık %5'inde görülmektedir. Delesyon tek başına olduğunda nispeten iyi bir prognoz görülmekte başka kromozom anomalileri delesyona eşlik ettiğinde kötü prognoz ve yüksek transformasyon görülmektedir (84).

En sık görülen 5q, 7q ve 20q delesyonlarına ek olarak daha az sıklıkta görülen ancak kromozomun bir kısmının veya tamamının karakteristik kaybını taşıyan del (13q), del (11q) ve del(12p) gibi anomaliler de MDS'de tanımlanmıştır (66)

- ***Kromozomal Translokasyonlar***

MDSli hastalarda, patogenezi de rol oynayan genlerin tanımlanması için iyi bir kaynak sağlayan bazı nadir görülen kromozomal translokasyonlar tanımlanmıştır. t(5;12)(q33;p13) translokasyonu bir grup kronik myelomonositik lösemi (KMML) hastasında tanımlanmıştır. 5. kromozomda bulunan gen, PDGFR'nin beta zincirini kodlamaktadır. Bu translokasyon bir füzyon geni ve bir füzyon proteini oluşturmaktadır (15).

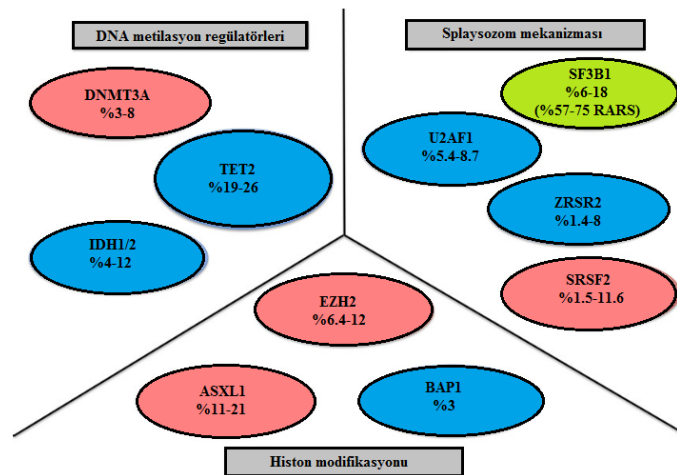
2.3.5.2. Moleküler Değişimler

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon, tek nükleotid polimorfizm mikrodizinleri ve yeni nesil sekanslama teknolojilerinin kullanımı, MDS'de mutasyon yoluyla sıklıkla inaktive olan önemli tümör baskılayıcı genlerin tanımlanmasını sağlamıştır. Aynı zamanda gelişen teknoloji MDS'nin %75-80'inde somatik gen mutasyonlarının tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Büyüme faktörü reseptörlerini, hücre döngüsü ve apoptozis regülatörlerini, transkripsiyon faktörlerini, hücre içi sinyal iletimini, epigenetik regülasyonu ve splaysozom mekanizmasını etkileyen değişik mutasyonlar MDS patogenezi ve progresyonunda rol oynamaktadır (85). RUNX1 ve TP53 gen mutasyonları da dahil olmak üzere tanımlanan mutasyonlar, sitokin sinyal iletimi (RAS genleri), DNA metilasyonu (TET2, IDH1/2, DNMT3A genleri), histon modifikasyonları (ASXL1 ve EZH2 genleri) ve splaysozom (SF3B1 ve SRSF2 genleri) olmak üzere dört temel fonksiyonel grupta toplanmaktadır (86). MDS'de sık görülen mutasyonlar Çizelge 2.11'de görülmektedir.

Çizelge 2. 11. MDS’de sık görülen gen mutasyonları

Gen	Mutasyon sıklığı (%)	Gen fonksiyonu
<i>SF3B1</i> <i>SRSF2</i> <i>U2AF1</i> <i>ZRSR2</i>	15–30 5–10 5–10 5	Splaysozom
<i>ASXL1</i> <i>EZH2</i>	10–20 3–7	Histon modifikasyonları
<i>RUNX1</i> <i>TP53</i> <i>ETV6</i>	5–15 5–10 3	Transkripsiyon faktörü
<i>N-/K-RAS</i> <i>JAK2</i>	5–10 3–4	Sinyal iletimi
<i>TET2</i>	15–25	DNA hidroksimetilasyon
<i>DNMT3A</i>	5–10	DNA metilasyonu
<i>BCOR/L1</i>	5–6	Transkripsiyon represörü

Varlığı çoğunlukla kötü prognoz ile ilişkili olan bu mutasyonlara, yaşlılarda ve hastalığın ileri evrelerindeki bireylerde daha sık rastlanmaktadır. Tanımlanan genlerin içinde DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları ile ilişkili genlerin bulunması dikkat çekicidir (87, 88). MDS’de epigenetik regülatör olan bu genlerde sık görülen mutasyonlar, MDS progresyonundaki epigenetik deregülasyonun (gen hipermetilasyonu ve histon deasetilasyonu) ne denli önemli olduğunun anlaşılmasına büyük ölçüde katkı sağlamaktadır. Bu bulgular MDS patojenezine ilişkin daha fazla bilgi elde edilmesinin yanında önemli klinik etkilere de sahiptir. Yüksek riskli MDS hastalarında geleneksel tedavi rejimlerine kıyasla DNA metiltransferaz inhibitörü 5-azasitidin kullanılması bu yana hastaların hayatta kalım süresinde artış olduğu görülmüştür (89-91).

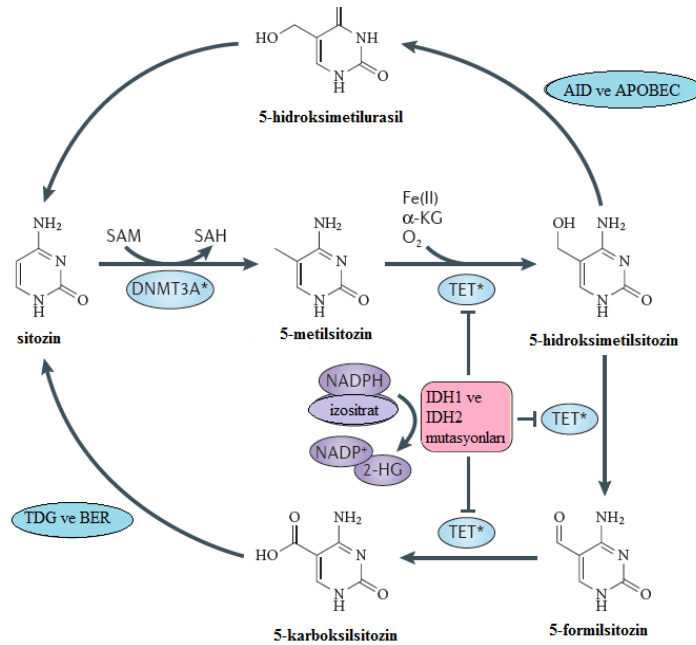


Şekil 2. 9. MDS’de epigenetik regülatör olan genlerdeki mutasyon sıklıkları (92)

MDS’de sık mutasyon görülen genler ve epigenetik profil üzerine etkili olan mutasyonların görüldüğü genlerden bazıları ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

TET2

TET2 MDS’de en sık mutasyonun görüldüğü genler ve bu genin tümör baskılayıcı gen gibi rol oynadığı düşünülmektedir. MDS hastalarının yaklaşık %10-26’sında TET2 geninde mutasyonlar veya delesyonlar tespit edilmiştir (93, 94). Tanımlanan bu mutasyonlar arasında yanlış anlamlı, sessiz mutasyonlar, çerçeve kayması mutasyonları ve bileşik heterozigot mutasyonlar bulunmaktadır. TET2 proteini DNA’nın yeniden düzenlenmesinde metilsitozinin hidrosimetilsitozine dönüşümünde rol oynamaktadır (95).



Şekil 2. 10. DNA metilasyonu ve demetilasyon yolağında görevli genlerdeki mutasyonlar (96)

2-HG, 2-hidroksiglutarat; α -KG, α -ketoglutarat; AID, aktivasyon-indüklü sitidin deaminaz; BER, baz kesip-çıkarma tamiri; DNMT3A, DNA metiltransferaz 3A; IDH, izositrat dehidrogenaz; NADP⁺, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat; SAH, S-adenozilhomosistein; SAM, S-adenozilmetiyonin; TDG, timin DNA glikozilaz

IDH1/ IDH2

MDS ve AML hastalarında, izositrat dehidrogenaz genlerinde mutasyonlar tanımlanmıştır (97, 98). IDH1 ve IDH2 normalde TET2 fonksiyonu için gerekli olan alfa ketoglutarat oluşumunu katalize etmektedir ancak mutasyon varlığında IDH alfa ketoglutaratın hematopoyetik farklılaşmayı bozan bir onkometabolit olan 2-hidroksiglutarata (2-HG)

dönüşümüne neden olmaktadır (99, 100). Alfa ketoglutarat histon demetilazlar için de gereklidir. Bu nedenle IDH1/2 genlerindeki mutasyonlar ve 2-hidroksiglutarat oluşumu yoluyla histon lizin metilasyonu inhibe olmaktadır (101, 102).

DNMT3A

DNMT3A, epigenetik modifikasyonu regüle eden metiltransferazlardan biridir. DNMT3A mutasyonlarının MDS hastalarında sıklığı ~% 8 iken de novo AML'de sıklığı ise ~% 22'dir ve kısa hayatta kalımla ilişkilidir (103-105). AML'de tanımlanan DNMT3A mutasyonlarının DNA metilasyonunda değişikliğe neden olduğu ve bunun da kötü prognozu işaret ettiği bilinmektedir. R882 mutasyonun sık görüldüğü bir bölgedir. AML hastalarının %20'sinde görülen bu tek nükleotid değişiminin 60 yaş üstünde M(4) ve M(5) alt tipleri ve orta riskli sitogenetik ile sıkı ilişki içinde olduğu görülmüştür (106). Yamashita ve ark. ile Yan ve ark.'nın yaptığı çalışmalar R882 pozisyonundaki mutasyonun DNA metilasyon aktivitesini azalttığını göstermiştir (107, 108). Gendeki mutasyonların DNMT3A aktivitesi ve global metilasyon paterni üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılmamış olsa da MDS klonlarını proliferasyona yönlendirdiği bilinmektedir.

EZH2

EZH2 (Enhancer of Zest homolog 2) mutasyonlarının MDS hastalarında sıklığı yaklaşık % 2-6'dır. EZH2 geni, bir histon metiltransferaz olan PRC2'nin katalitik alt ünitesini kodlamakta ve epigenetik kontrolde fonksiyon görmektedir. Gende meydana gelen mutasyonlar histon metiltransferaz aktivitesinin disfonksiyonu ile sonuçlanmakta ve bu durum genin myeloid maligniteler için bir tümör baskılayıcı gibi rol oynayabileceği fikrini doğurmaktadır (109, 110). EZH2 geninin çeşitli kanser doku tiplerinde sıklıkla ekspresyonu artmakta ve onkogenik aktivitesi ortaya çıkmaktadır.

Çizelge 2. 12. MDS ve AML’de görülen gen mutasyonlarının epigenetik profil üzerine etkileri (111)

Gen	MDS ve AML’de % sıklık	Mutasyon etkileri
TET2	20	Demetilasyon fonksiyonunun kaybı
IDH1/2	6-8(IDH1), 9 (IDH2)	TET2’nin katalitik fonksiyonunun engellenmesi
DNMT3a	8-22	Bilinmiyor
EZH2	6-7	Kök hücre yenilenmesi için gerekli olan genlerin ekspresyonlarının baskılanması, hayatta kalımın kısılması
UTX	11	H3K27 demetilaz aktivitesinde muhtemel kayıp
ASXL1	14-16	Kromozom bağlama kapasitesinde muhtemel azalma
RUNX1	9	Ciddi trombositopeni, hayatta kalımın kısılması
JARID2	2	Lösemik transformasyon şüphesi

RAS

Çok basamaklı MDS patogeneğinde özellikle RAS protoonkogenleri başta olmak üzere onkogenlerin önemli bir yeri vardır. Hücre proliferasyonunun önemli bir sinyal komponenti olan RAS, Reseptör tirozin kinazlar (RTKs) tarafından aktive edilir. RAS geni hücre membranlarının iç yüzeyinde yer alan ve nükleusa sinyal iletiminde rol oynayan GTP bağlayan proteinleri kodlamaktadır. Bu genin kodon 12, 13 ve 61’deki nokta mutasyonları ile aktive olduğu bilinmektedir (112). RAS mutasyonları sadece MDS’de değil, diğer myeloid neoplazmlarda da görülmektedir. RAS genleri içinde en sık görülen N-Ras gen mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar lösemilerde %20-30 arasında görülürken MDS’de %10-15 oranında görülmektedir (113).

FLT3 geni

FLT3 geni, hematopoyetik öncül hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan reseptör tip protein kinazı (receptor-type tyrosine kinase) kodlamaktadır. FLT3 genindeki mutasyon AML’de %15-20 ve MDS’de %5 oranında görülmektedir (114). Bu anomalilerin hastalığın geç safhalarında ortaya çıktığı ve hastalarda kötü prognoza eğilime neden olduğu görülmektedir. Bu durum FLT3 tandem duplikasyonunun MDS’den lösemik transformasyonla ilişkili olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır (115).

P53

Proliferasyon, farklılaşma ve apoptozisin regüle edilmesinde fonksiyonel, önemli bir tümör baskılayıcı gen olan p53'deki değişimler farklı kanser tiplerinde görülmektedir (116). P53'ün her iki allelde mutasyonlar ya da delesyonlar yoluyla inaktive olması hücreleri neoplastik transformasyona yatkın hale getirmektedir. MDS'nin lösemik progresyonunda rol oynayan P53 mutasyonları, MDS ve AML hastalarının %5-10'nunda tespit edilmiştir (117, 118) ve çoğunlukla kompleks karyotip ve kötü prognozla ilişkilidir (119).

TP53 mutasyonları ve TP53 lokusunun bulunduğu 17p'nin kaybı sıklıkla alkali ajanlarla yapılan tedavi sonrası ve kromozom 5 ve 7 aberasyonları taşıyan kompleks karyotipe sahip hastalarda (tedavi-ilişkili MDS) görülmektedir (120-122). TP53 mutasyonları, amplifikasyonlar ve sentromerik kırılma noktaları oluşumunda çok önemli bir role sahip oldukları için genomik instabilitiyeye neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalar del (5q) taşıyan düşük riskli MDS hastalarında bu gendeki mutasyonların hastalık progresyonunda etkili olduğunu göstermiştir (123).

AML1 (RUNX1)

MDS'li hastalarda özellikle de RAEB, RAEB-t ve MDS-AML'de, RUNX1 geninde yüksek sıklıkta nokta mutasyonu tanımlanmıştır (124). Mutasyonun MDS'de görülme sıklığı %12-15.7 iken MDS ilişkili AML'de ise %27.7'dir (125, 126) Gen, hematopoietik kök hücrelerin olgun kan hücrelerine dönüşümünü regüle eden Runt domaini ile DNA bağlanma aktivitesi sağlayan, heterodimerik bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Erken myeloid farklılaşmada merkezi bir göreve sahip olan gendeki tüm değişimler myeloid transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyon başlama bölgelerine protein kompleksinin bağlanmasını ve myeloid farklılaşmanın başlamasını engelleyerek RUNX1 inaktivasyonuna yol açmaktadır (127).

RUNX1 mutasyonlarının varlığı MDS'den AML'ye progresyonun insidansını artırmakta ve yabani tip hastalarla kıyaslandığında mutasyon taşıyan hastalarda daha kısa hayatta kalıma neden olmaktadır (128, 129).

2.4. Epigenetik

Epigenetik, DNA dizisindeki değişimlerden bağımsız, gen ekspresyonunda meydana gelen mitotik veya mayotik kalıtsal değişimler olarak tanımlanmaktadır (130, 131). Epigenomun üç temel bileşeni DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve RNA interferanstır(132).

DNA modifikasyonu ve kromatin değişimlerinin doğruluğu normal embriyonik gelişim, hücrel farklılaşma, hücre proliferasyonu, X-kromozom inaktivasyonu, hücre döngüsü progresyonu, hücre ölümünün kontrolü gibi biyolojik proseslerin düzenlenmesinde önemlidir (133, 134). Epigenetik aynı zamanda gen ekspresyonunun regülasyonunda kritik role sahip olduğu için gen ekspresyon profilinde dengesizliğe yol açabilecek kontrol dışı ve/veya yanlış modifikasyonlar normal hücrenin malignant hücreye transformasyonu ile sonuçlanabilmektedir.

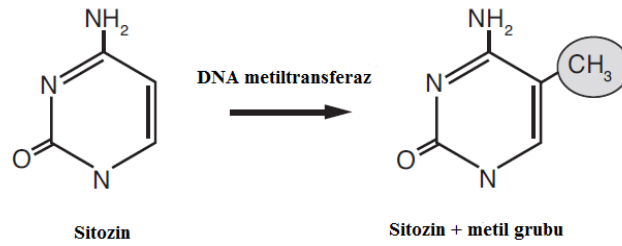
DNA metilasyonu, histon proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonu ve nükleozomun yeniden düzenlenmesi gibi epigenetik mekanizmaların birlikte koordineli çalışmaları ile genlerin ifadesinde kalıtsal değişiklikler meydana gelmektedir (135, 136). Gen ifadesi transkripsiyon aktivatörleri ve represörleri ile bu bileşenler tarafından regüle edilmektedir (137). Mekanizmaların herhangi birinde hata oluşması, genlerin ifadesinin aşırı artması ya da baskılanması şeklinde uygun olmayan ekspresyon ile sonuçlanmakta bu da epigenetik hastalıklara neden olmaktadır (132, 138)

2.4.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, CG dinükleotidlerindeki sitozininin 5. karbonuna bir metil grubu eklenmesi ile gerçekleşmektedir (139, 140). CG dinükleotidi bakımından zengin (%55'ten çok), 0.2-5 kb uzunluğunda ve çoğunlukla genlerin promotor bölgelerinde bulunan genomik diziler CpG adacıkları olarak tanımlanmaktadır (141, 142). Memeli genomunda metilasyon sadece CG dinükleotidlerindeki sitozinden gerçekleşmektedir. Metilasyon süreci DNA metiltransferazlar, metal bağlama domain proteinleri (MBD1, MBD2 ve MeCP2) (143) ve histon deasetilazlar tarafından düzenlenmektedir (144).

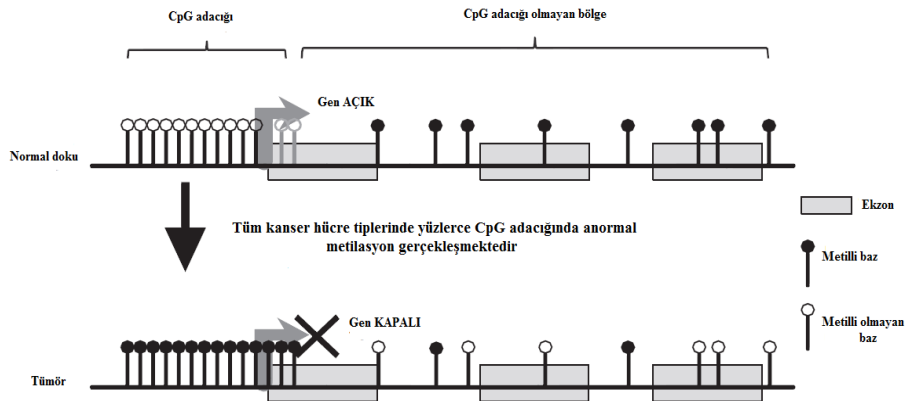
DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'den oluşan DNA metiltransferazlar CpG dinükleotidlerindeki sitozin rezidüsüne metil grubu takılmasını katalize ederek epigenetik

modifikasyonları regüle etmektedir (145). DNMT3A ve DNMT3B de novo metilasyon için önemliyken, DNMT1 metilasyonun sürdürülmesinde gerekli bir enzimdir (146, 147). DNA metiltransferazlar, metil vericisi olarak S-adenosil-L-metionin'i kullanır (148). Genomda tekrar dizilerinin ve transpozonların bulunduğu heterokromatinde metilasyon oranı yüksektir. İnsan genomunda, transpozonların genomdaki hareketi baskılanarak kromozomun kararlı halde kalmasının sağlanması, viral genomlara karşı mücadele edilebilmesi ve belirli genlerin transkripsiyonel baskılanması CpG metilasyonunun DNA metiltransferazlar tarafından sürdürülmesi ile mümkün olmaktadır.



Şekil 2. 11. DNA metilasyonu, sitozine metil grubu takılması (111)

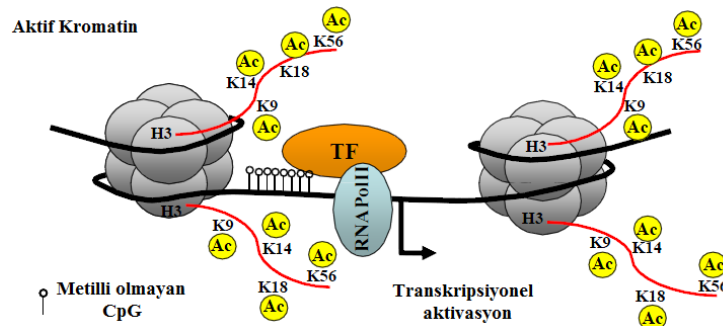
Genomun önemli bir bileşeni olan DNA metilasyonu, en çok çalışılmış ve en iyi karakterize edilmiş epigenetik mekanizmadır. Embriyonik gelişim (149), transkripsiyon regülasyonu (150), kromatinin yeniden düzenlenmesi, X kromozom inaktivasyonu(151), genomik imprinting (152), hücreyel farklılaşma, gelişimin kontrolü (153) ve kromozom stabilitesinin korunması gibi birçok hücreyel süreçte düzenleyici rol oynamaktadır (154). Ayrıca kök hücre popülasyonunun sürdürülmesinde, kök hücrelerin kompleks dokuları oluşturmak üzere hiyerarşik düzende değişik organizasyon seviyelerine farklılaşmalarında da önemli olduğu bilinmektedir (155).



Şekil 2. 12. Promotor bölgedeki CpG adacık metilasyonunun gen ekspresyonu üzerindeki etkisi (111)

2.4.2 Histon Modifikasyonu

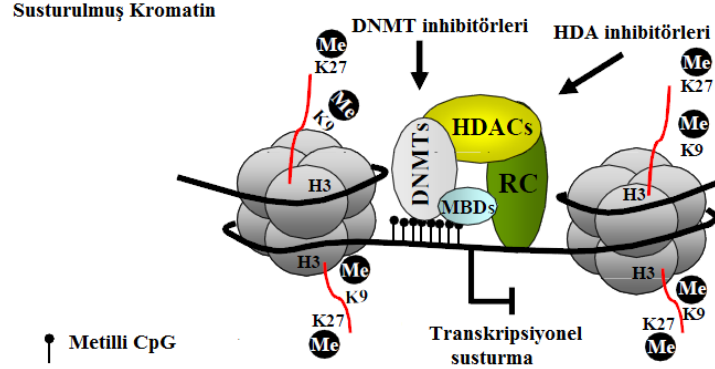
Ökaryotik hücrelerde, 146 baz uzunluğundaki DNA ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4 histon protein ile paketlenerek nükleozom yapısını oluşturmaktadır (156). DNA'nın nükleozom yapısındaki paketlenme durumu kromatinin kondanse (heterokromatin) ve inaktif ya da gevşek (ökromatin) ve transkripsiyon için uygun olmasını belirlemektedir (157). Genin ifade edilmesi DNA ve histon proteinlerinin oluşturduğu paketlenmenin gevşemesi ve nükleozom yapısının yer değiştirmesi olarak bilinen remodelling (yeniden düzenlenme) ile mümkün olmaktadır.



Şekil 2. 13. Histon modifikasyonu, aktif kromatin yapısı (158)

Histon proteinlerinin amino ucunda asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinizasyon, ADP ribozilasyon ve sumozilasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar gerçekleşmektedir. Modifikasyonların histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirdiği ve protein kompleksleri için tanıma bölgesi oluşturduğu düşünülmektedir. Böylece histon-DNA ve histon-histon ilişkisi etkilenmekte, DNA paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olay kontrol edilebilmektedir. Modifikasyonlar tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda bulunarak kromatine bazı anlamlar yüklemekte veya bu anlamları değiştirebilmektedir. Üzerinde en çok çalışılan histon modifikasyonu asetilasyon ve metilasyondur. Histonların asetilasyonu histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzim aileleri tarafından düzenlenmektedir. (159). Negatif yüklü asetil grubunun histon proteininin amino ucuna takılmasıyla pozitif yüklü lizin aminoasiti yükünü kısmen kaybetmekte, kromatinde gevşeme meydana gelmekte, transkripsiyon faktörlerinin genlerin promotor bölgelerine ulaşmaları kolaylaşmakta ve bu sayede transkripsiyon gerçekleşmektedir. Asetilasyon geri dönüşümlü olarak gerçekleşen bir olaydır. Lizin aminoasitinden asetil grubunun çıkartılmasıyla kromatin tekrar kondanse olmakta ve transkripsiyon

baskılanmaktadır. Kromatinin belli bir bölgesinde histonların asetile olması, o bölgenin transkripsiyonel açıdan aktif olduğunu gösterirken, deasetile olması transkripsiyonun baskılandığını göstermektedir (160).



Şekil 2. 14. Histon modifikasyonu, susturulmuş kromatin yapısı (158)

2.4.3. RNA İnterferans

RNA interferans, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) hücreye girmesi ve komplementer olduğu mRNA'nın yıkımına neden olması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. RNA'lar, histon modifikasyonları ve DNA metilasyonunun başlamasında itici güç rolü oynamakta, heterokromatin düzenlenmesi ile mitotik olarak kalıtlanabilen transkripsiyonel susturma sağlayabilmektedir. Posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel gen susturmada (PTGC) rol oynayan RNA molekülleri miRNA (micro RNA) ve siRNA'lardır (small-interfering RNA) (161-163). Bunlar küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA'lardır. Gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptozis gibi önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol alırlar (164, 165)

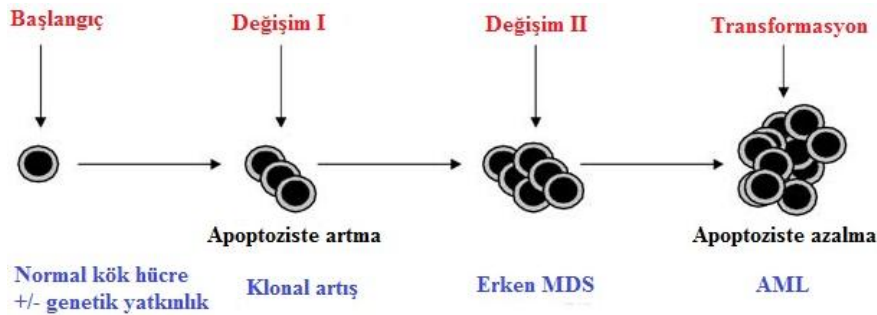
RNA interferans süreci, çift zincirli RNA'nın Dicer adı verilen RNase III enzimi tarafından 21-23 nükleotid uzunluğundaki küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamaktadır (166). Bu siRNA'lar bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA indükleyici baskılama kompleksine (RISC, RNA-induced silencing complex) bağlanır. RISC, siRNA'ları komplementer mRNA'yı bulmak için kullanır ve hedef mRNA'yı endonükleolitik olarak keser (167). Postranskripsiyonel gen susturulması, mRNA molekülünün diziye özgü yıkıma uğraması ya da translasyona girememesiyle gerçekleşmektedir. Bu süreçte mRNA'nın kodlandığı genin transkripsiyonunda bir

değişiklik olmamakta, sentezlenmiş olan mRNA'ya küçük ve kodlamayan bir RNA zincirinin bağlanması sonucu protein ifadesi baskılanmaktadır. RNAi mekanizması mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda görülmektedir (168).

2.5. MDS'den AML'ye Transformasyon

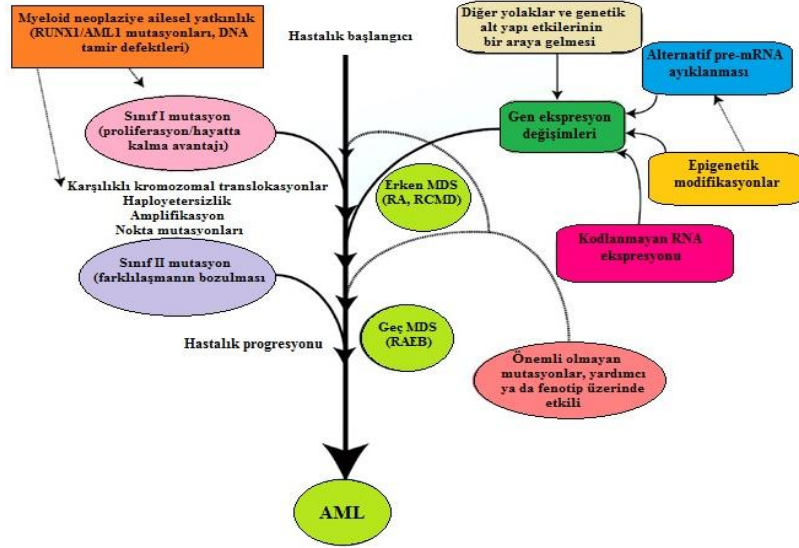
İnefektif hematopoezis ve pansitopeni ile karakterize klonal bir hematopietik kök hücre bozukluğu olan MDS'de hematopietik kök hücrelerin nicelik ve niteliğinde meydana gelen hasarlar sonucunda hastaların yaklaşık %30'unda AML'ye dönüşüm görülmektedir. Bu durum özellikle sekonder akut myeloid lösemi (sAML veya MDS/AML) olarak da isimlendirilen yüksek riskli MDS'de daha yaygındır. Lösemik transformasyon riski en düşük olan RARS iken en yüksek olan RAEB-t alt tipidir.

MDS'nin çok basamaklı patogenezi (Şekil 2.15), hastalık hematopietik kök hücreden başlamakta, ilerleyen aşamada ise hücre döngüsü kontrolünü, transkripsiyonu ve tümör baskılayıcı genleri etkileyen mutasyonlar, amplifikasyonlar ve kromozomal yeniden düzenlemeler gibi değişimler gerçekleşmektedir. Bu değişimlere ek olarak, özellikle de önemli sinyal yollarında bulunan genlerde (Ras gibi) veya kök hücre büyüme faktörü reseptörlerinde (Flt3 veya c-kit aktive edici mutasyonlar) meydana gelen ikincil mutasyonlar kök hücrelerin olgun kan hücrelerini üretememesiyle sonuçlanmakta ve bu durumda "blast" ların sayısında ciddi artışa neden olmaktadır. Blast sayılarındaki artış MDS'den akut lösemiye dönüşümü tetiklemektedir. Blast sayısı kemik iliğinde %20' nin üzerine çıkan MDS olgularının akut lösemiye dönüştüğü kabul edilmektedir. Lösemiye progresyon genetik değişimlerin hangi genlerde gerçekleştiği ile doğrudan ilişkilidir ve tümör baskılayıcı genlerdeki değişimler ve/veya kritik öneme sahip genlerin hipermetilasyonu son basamak olan lösemik transformasyonu kuvvetlendirmektedir.



Şekil 2. 15. MDS'nin çok basamaklı patogenezi (19)

MDS'den AML'ye progresyon sürecinde mutasyonlar, epigenetik modifikasyonlar, sinyal iletim yollarındaki deregülasyonlar, gen ekspresyon değişimleri gibi birçok faktör etkili olmaktadır.



Şekil 2. 16. MDS'den AML'ye progresyona ilişkin model (169)

2.6. Akut Myeloid Lösemi

Lösemi, kan ve kemik iliğinden köken alan hücrelerin klonal çoğalması ile oluşan bir kanser çeşididir. En sık görülen kanserlerden biri olan lösemide kemik iliğinde çok sayıda lökosit üretilmekte ancak bu hücrelerde olgunlaşma problemi yaşandığı için hücreler fonksiyonlarını yerine getirememektedir. Lösemiler, klinik ve patolojik seyre göre akut (hızlı ilerleyen) ve kronik (yavaş ilerleyen) lösemi ve lösemik blastın köken aldığı öncül hücreye göre (lenfoid/myeloid) sınıflandırılmaktadır.

Lösemiler,

- Akut myeloid lösemi (AML)
- Akut lenfositik lösemi (ALL)
- Kronik myeloid lösemi (KML)
- Kronik lenfositik lösemi (KLL) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır.

Akut myeloid lösemi, hematopoietik kök hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşmasının bozulması sonucu kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda olgunlaşmamış myeloid

hücrenin birikimi ve sağlıklı hematopoietik hücrelerin üretiminde azalma ile karakterize klonal kök hücre bozukluğudur. Akut lösemi tanısının konulabilmesi için kemik iliğinde blast oranının \geq % 20 olması gerekmektedir. Kemik iliğindeki blast oranı hastalık seyrini etkilemektedir. Her yaşta görülebilmekle birlikte tipik olarak bir ileri yaş hastalığı olan akut myeloid lösemi (AML) erişkin yaş grubunda en sık rastlanan lösemi tipidir. Hastanın yaşı, performansı yanında lösemik klonun sitogenetik ve moleküler özellikleri prognozu belirleyen en önemli parametrelerdir. Tüm yaş gruplarında benzer klinik özellikler görülmekle birlikte, semptomlar blastik hücrelerin artması ve kemik iliği hücrelerinin yerini alması ile oluşan bozulmuş hematopoiezis ve buna bağlı olarak gelişen sitopenilerdir. Sitopeniler, anemi semptomları (yorgunluk, nefes darlığı gibi), nötropeni (enfeksiyonlar), trombositopeni (hemoraji-kanama) gibi klinik belirtilere neden olmakta, teşhis ve tedavi süresince baskın olarak görülmektedir. AML, genetik ve fenotipik olarak heterojen özellik göstermektedir. AML'de hastaların ortalama yaşı 65 ile 70 arasındadır. AML'nin insidansı 5-8/100.000 iken mortalite hızı yılda %75-80 arasında değişmektedir.

FAB (French American British) sınıflandırmasına göre AML M0-M7 olmak üzere sekiz alt grupta toplanır (14-17).

Çizelge 2. 13. Fransız, Amerikan, İngiliz (FAB) AML sınıflandırması

Alt tip	Tanımlama
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut myeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut myeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut myeloblastik lösemi
M3	Promyelositik veya Akut promyelositik lösemi (APL)
M4	Akut myelomonositik lösemi
M4Eo	Akut eozinofili ile seyreden akut myelomonositik lösemi
M5	Akut monoblastik lösemi (M5a) veya Akut monositik lösemi (M5b)
M6	Akut eritro lösemi
M7	Akut megakaryoblastik lösemi

AML'deki genetik mutasyonların tanımlanması lökomogenezin anlaşılmasında büyük ilerleme sağlamıştır. Özellikle yeni nesil sekanslama ve yüksek rezolüsyonlu SNP-array gibi teknolojilerin kullanımı AML'de tekrarlayan gen mutasyonlarının tanımlanmasını mümkün kılmıştır.

Çok basamaklı bir süreç olan AML gelişiminde hastalık oluşumu için en az iki genetik anomalinin gerçekleşmesi gerekmektedir. Gilliland ve Griffin'in multistep AML gelişimi

için önerdikleri modelde sınıf I ve sınıf II mutasyonların önemli rol oynadıkları ifade edilmiştir (170). Sınıf I mutasyonları sinyal iletim yollarını aktif hale getirmekte ve hematopoietik kök hücreler üzerinde proliferasyon avantajı sağlamaktadır. Sınıf II mutasyonlar ise transkripsiyon faktörlerini etkilemekte ve öncelikle bozuk hematopoietik farklılaşmaya katkıda bulunmaktadır (171, 172).

Sınıf I mutasyonları: FLT3, PTPN11, NRAS, KIT ve CBL mutasyonları

Sınıf II mutasyonları: RUNX1, C/EBP α mutasyonları ve MLL yeniden düzenlenmeleri

Füzyon transkriptleri oluşturan t(8; 21), inv(16) ve t(15; 17) gibi tekrarlayan kromozomal aberasyonlar da sınıf II mutasyonlara dahil edilmektedir. Bu mutasyonlar haricinde de DNMT, TET2, IDH1, IDH2, NPM1, ASXL1 gibi genlerde de genetik değişimler görülmektedir ancak bunlar henüz sınıflandırılmamıştır (173).

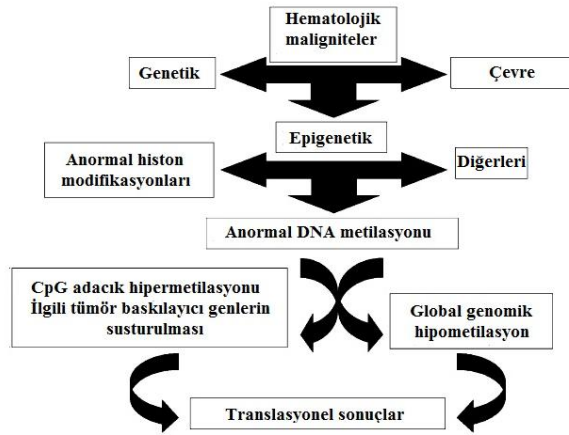
2.7. MDS ve AML Odağında Kanserde Epigenetik

Karsinogenezis, normal bir hücrenin genetik ve epigenetik aberasyonların kademeli bir şekilde birikimi ile genetik yapısının bozulması sonucunda kontrolsüz bölünme ve ölümsüzleşme avantajı sağlayan tümör hücresine dönüşümü sürecidir. Bu süreçte etkili iki gen sınıfı olan tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerde meydana gelen değişimler kansere neden olmaktadır. Kansere oluşumundaki hipotezlerden biri Knudson tarafından ortaya atılan iki vuruş hipotezidir. Bu hipoteze göre, birtakım değişimlerle tümör baskılayıcı genlerin iki alelinin de inaktive olması gerekmektedir. Bu iki vuruştan biri genetik (nokta mutasyonları, inversiyon, mikrolezyon veya makrolezyonlar ve translokasyonlar), diğeri epigenetik (promotor bölge metilasyonu) olabileceği gibi her ikisi de genetik veya epigenetik olabilmektedir. Yapılan pek çok çalışma metilasyon ilişkili susturmanın tümör baskılayıcı genlerin inaktive edilmesinde en az mutasyonlar kadar etkili olduğunu, bunun kansere zemin hazırlayan, Knudson'nın ikili vuruş hipotezinde tanımladığı vuruşlardan biri olarak rol oynayabileceği fikrini doğrulamaktadır (174, 175).

Feinberg tarafından önerilen kanserin epigenetik progenitör modeline göre ise kanser üç basamakta gerçekleşmektedir (176). Belirli bir dokuda, kök hücre ya da progenitör hücrede gerçekleşen epigenetik değişim devamında gerçekleşen mutasyon ve bunu takiben genetik

ve epigenetik kararsızlığın yol açtığı daha fazla tümör gelişimi şeklinde oluşmaktadır. Kanserde epigenetik değişimlerin başlangıç mutasyonlarından önce gerçekleşmesi ve yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular bu hipotezi desteklemektedir (177-179)

Kanser oluşum süreci ile metilasyon paterni değişimleri arasındaki ilişki 1980'li yılların başından beri bilinmektedir (180). Kanser gelişimi ve progresyonunda merkezi rol oynayan epigenetik deregülasyon, onkogen aktivasyonu ve kromozomal instabiliteye neden olan hipometilasyon, hipermetilasyon ve tümör baskılayıcı gen susturulması ve gen ekspresyonunu düzenleyen metilasyon değişimlerini kapsamaktadır (181). Gerek solid tümörlerde gerekse hematolojik malignitelerde epigenetik değişimler neticesinde kanser hücrelerinde anormal promotör hipermetilasyonu ve global hipometilasyon birlikte görülmektedir (178, 182).



Şekil 2. 17. Hematolojik malignitelerde epigenetik (183)

Perisentromerik ve sentromerik bölgelerin, tekrarlayan elemanların, entegre/susturulmuş viral sekansların hipometilasyonu ile susturulmuş diziler ve onkogenlerin reaktivasyonu yoluyla onkojenik etki ortaya çıkmaktadır (184, 185). Diğer taraftan promotör CpG adacıklarının anormal hipermetilasyonu bilinen veya aday tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel susturulmasına yol açmaktadır (139, 144). Bu prosesin oluşum sıklığı, bu süreçte etkilenen genlerin çeşitliliği ve kanserlerin geniş birikimli doğası, kanser başlangıcında ve progresyonunda promotör bölgelerinde bulunan CpG adacıklarında görülen metilasyonun önemli bir epigenetik mekanizma olduğunu vurgulamaktadır. Erken karsinogenez sürecinde görülen CpG adacıklarının anormal de novo metilasyonu insan kanserlerinde önemli bir ayırıcı özelliktir (186). Birçok tümör tipinde bazı genlerin hipermetile olduğu gösterilse de, genellikle kanser hücrelerinde hipermetile olan genlerin

paterni rastgele değildir, doku spesifiktir. Anahtar hücre yolaklarının temel bileşeni olan DNA tamiri (MLH1, MGMT, BRCA1), hücre döngüsü (p16INK4a, p15INK4b, p14Arf), hücre invazyonu ve tutunması (E-cadherin, APC, CDH13, VHL), apoptozis, detoksifikasyon ve hormonal cevap (retinoik asit reseptör β 2 ve östrojen reseptörü) olmak üzere birçok değişik fonksiyonda görevli olan genler kanserlerde hipermetilasyon yoluyla inaktive olmaktadır. Bu yolaklarda görülen deregülasyon etkilenmiş hücrelere hayatta kalma avantajı sağlamakta ve bu durum da karsinogenez sürecine doğru adım adım ilerlemeye katkıda bulunmaktadır (182, 187).

Çizelge 2. 14. Kanserde epigenetik olarak regüle edilen genler ve genlerin bulunduğu yolaklar (182, 188)

Yolak	Genler
Hücre döngüsü kontrolü	Rb, p14, p15, p16, p73, cyclin D2, cyclin E,
Hücre invazyonu ve tutunması	E-cadherin, APC, TIMP-3, VHL
Apoptozis regülasyonu	DAP kinase 1, caspase 8, TMS-1
DNA tamiri	O ⁶ MGMT, hMLH1, BRCA1, GST π , FNACF
Hormonal cevap	RAR β 2, CRBP1, SOCS-1, SOCS-3, ER, PGR
Sinyal transdüksiyonu	ErbB2, RASSF1, LKB1/STK11, APC
Karsinojen metabolizması	GSTP1
Senesens	TERT, TERC
Transkripsiyon	Runx3, Twist, ER α , ER β , RAR

DNA metilasyonu, kromatin yapısını ve transkripsiyonel aktiviteyi etkileyen, hematopoietik kök hücrelerin hem normal gelişiminde hem de patogenezinde güçlü etkiye sahip olan bir mekanizma olması yönüyle kanser patogenezinin aydınlatılmasında DNA metilasyonunun ve gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin anlaşılması çok önemlidir. Anormal DNA metilasyonu MDS'de en çok çalışılan ve en iyi anlaşılabilen epigenetik değişimdir. Hücre döngüsü regülatörleri, apoptotik genler ve DNA tamir genleri gibi epigenetik olarak susturulmuş olan değişik genlerin patogenezinde ve lösemiye transformasyonda önemli etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu genlerin MDS patofizyolojisinde etkinlikleri ve hastalığın prognozu araştırılarak, düşük ve yüksek risk taşıyan hasta gruplarının değişik metilasyon paterni gösterdiği ortaya konmuştur (189).

Karsinojenik yolaklarda önemli olan çok sayıda gen MDS ve AML'de sıklıkla hipermetilelidir (Çizelge 2.15). MDS hastalarında DNA metiltransferaz ekspresyon seviyesinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada DNMT1 ve DNMT3A ifadesinin

kontrollere göre hastalarda daha yüksek çıktığı belirlenmiştir (190). DNA metiltransferazların fazla ekspresyonu MDS’de birçok genin hipermetile olmasına neden olabilmektedir. Ayrıca bu durum MDS hastalarında DNMT inhibitörlerinin tedavi amaçlı kullanımını klinik cevap alınması açısından da neden önemli bir hedef olarak gördüklerini açıklamaktadır. AML ve CLL örneklerinde de DNA metiltransferaz ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (191, 192).

Çizelge 2. 15. MDS ve AML’de yaygın görülen hipermetile genler (111)

Gen	Fonksiyonu	MDS ve AML’de ~% sıklık	Hipermetilasyon sonucu
P15	Hücre döngüsü regülasyonu	38	Kısa hayatta kalım
WNT inhibitörleri	Wnt sinyal yolağı regülasyonu	62	Lökomogenezis
Kalsitonin	Kalsiyum ve fosfor metabolizması	65-92	AML’ye progresyon
DAPK-1	Apoptozis	63	Prognoz üzerine etkisi tanımlanmamış
E-cadherin (CDH1)	Hücre adezyonu	27	Kısa hayatta kalım
SOCS-1	Tümör baskılayıcı	47	AML progresyonuna artmış risk
PI-PLCβ1	Hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolü	44	AML progresyonuna artmış risk
HIC-1	Tümör baskılayıcı	32	Kısa hayatta kalım
ER	Hormon reseptörü	19	Kısa hayatta kalım
RIZ1	Hücre döngüsü regülasyonu	31-50	Henüz bilinmiyor
GATA1	Eritropoietik farklılaşma	bilinmiyor	İnefektif eritropoiezise neden olma
CDKN2A, B	Tümör baskılayıcı	38–77 (CDKN2A) 77–100 (CDKN2B)	Artmış hastalık progresyonu
FHIT	Tümör baskılayıcı	14-55	Hastalık progresyonuyla potansiyel ilişki
RIL	Tümör baskılayıcı	36	Kısa hayatta kalım
SHP-1	JAK/STAT sinyal yolağı regülatörü	≤69	Kısa hayatta kalım
BLU	Tümör baskılayıcı	43	MDS gelişiminde potansiyel rol

Hopfer ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada ise yüksek rikslı MDS’de anormal promotor metilasyonu ve DNMT ekspresyonunun tüm serilerde ve eritropoiezis süresince ilişkili olduğu görülmüştür. p15, p16, p73, survivin, CHK2, RARb ve DAPK genlerindeki hipermetilasyonun DNMT izoformlarının yüksek ekspresyonuyla ilişkili olduğu

bulunmuştur. Tüm memelilerde, DNMT izoformları MDS’de normal olmayan metillenmiş fenotipe yol açmaktadır ve aynı zamanda DNMT izoformlarının normal hematopoietik kök hücre farklılaşması için de oldukça önemli oldukları görülmektedir (193).

Siklin bağımlı kinaz inhibitör genleri olan p15INK4B (CDKN2B) ve p16INK4A’nın (CDKN2A) genetik/epigenetik değişimler sonucunda birçok kanserde inaktive olduğu tespit edilmiştir (194, 195). Bu genlerdeki genetik değişimler lenfoid malignitelerle kısıtlıyken (196), anormal 5’CpG adacık metilasyonunun değişik hematolojik malignitelerde görüldüğü rapor edilmiştir (197). TGF beta tarafından ekspresyonu indüklenen CDK4 ve CDK6’nın inhibitörü ve hücre döngüsünün G1/S fazı geçişinde görevli bir tümör baskılayıcı gen olan p15’in MDS hastalarının %30–50’sinde hipermetile olduğu ve kemik iliği blast yüzdesiyle korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Genin metilasyonuna yönelik yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, p15 geni hipermetilasyonunun kötü prognozla ilişkili olduğunu, MDS patogenezinde önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu metillenmenin MDS’nin AML’ye transformasyonu ile ilişkili olduğu da tespit edilmiştir (198-201). AML hastalarında da p15 geninde hipermetilasyon kötü prognoza eşlik etmektedir bu nedenle gendeki metilasyon klinik inceleme ve risk değerlendirmesinde potansiyel önemli bir prognostik faktör olarak görülmektedir (202-204).

MDS patogenezinde rol oynayan hipermetile genler arasında GTPaz regülatörü olan DOCK4 ve kritik bir eritropoietik transkripsiyon faktörü olan GATA1 de bulunmaktadır. MDS hastalarından elde edilen CD34+ hücrelerde dikkate değer bir hipermetilasyon gözlenmiştir ve ön klinik çalışmalar DOCK4 geni susturulmasının diseritropoiezisten sorumlu olan etkenlerden biri olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda GATA1 hipermetilasyonu da MDS’de gözlenen inefektif eritropoizise neden olmaktadır (205, 206).

Östrojen reseptör (ER) metilasyonu akut myeloid lösemi de dahil olmak üzere hematopoietik neoplazmlarda sıklıkla görülen bir moleküler değişimdir. Hematopoietik neoplazmların gelişiminde önemli bir basamak olarak görülen ER metilasyonu, hastaların klinik durumlarının izlenmesinde kullanışlı olabilecek bir moleküler belirteç olarak görülmektedir (207, 208).

E-kaderin (CDH1) geni AML'de ve diğer hematolojik malignitelerde sıklıkla hipermetilasyon gösteren diğer bir gendir. E-kaderin proteini tümör hücrelerinin invazyonu ve metastazını baskılayabilme özelliği gösterdiği için proteini kodlayan E-kaderin geni metastaz baskılayıcı gen olarak isimlendirilmektedir. Ekspresyonu eritroblast ve normoblast olgunlaşması için gerekli olan genin lösemik blast hücrelerde ekspresyonunun azaldığı ya da hiç olmadığı görülmüştür. Bu bulgular, gende görülen hipermetilasyonun AML patogenezinde ve azalmış ekspresyon seviyesinin lökomogeneziste önemli olduğunu göstermektedir (209, 210).

Reseptör sinyal yolağındaki (RTK/RAS) mutasyonlar çoğunlukla myeloid tümörlerde proliferasyon sinyali oluşturmaktadır. Bu bilgiden yola çıkarak yapılan bir araştırmada MDS ve AML hastalarında anılan yolakta negatif düzenleyici olarak rol oynayan RASSF1A, SOCS-1 ve SHP-1 genlerinin metilasyon spesifik PCR ile yapılan metilasyon analizlerinden elde edilen veriler değerlendirilmiş, RASSF1A ve SOCS-1 genlerindeki epigenetik inaktivasyonun lökomogeneziste rol oynayabileceği belirtilmiştir. JAK/STAT yolağında negatif regülasyon elemanlarından biri olan SHP-1'in hipermetilasyonu ise proliferatif etkilere neden olması açısından önem taşımaktadır (211)

11. kromozomda bulunan kalsitonin (CTMR) geninin, akut myeloid lösemide çoğunlukla hipermetile olduğu bilinmektedir. Kronik myeloid lösemisinin kronik fazında normal olarak metile bulunan gen hastalığın ilerlemesiyle birlikte hipermetile hale gelmektedir. 24 MDS hastasının dahil edildiği bir araştırmada kalsitonin geninde hipermetilasyon tespit edilmiş ancak mevcut metilasyon ve hastalık arasında korelasyon bulunmamıştır. Kalsitonin hipermetilasyonu hastalığın erken patogenezinde oluşan bir durum olarak kendini göstermektedir (212). Bu araştırmadan elde edilen veriler ışığında kalsitonin genindeki hipermetilasyonun MDS'nin AML'ye dönüşümünde kullanılabilecek önemli bir belirteç olabileceği belirtilmiştir.

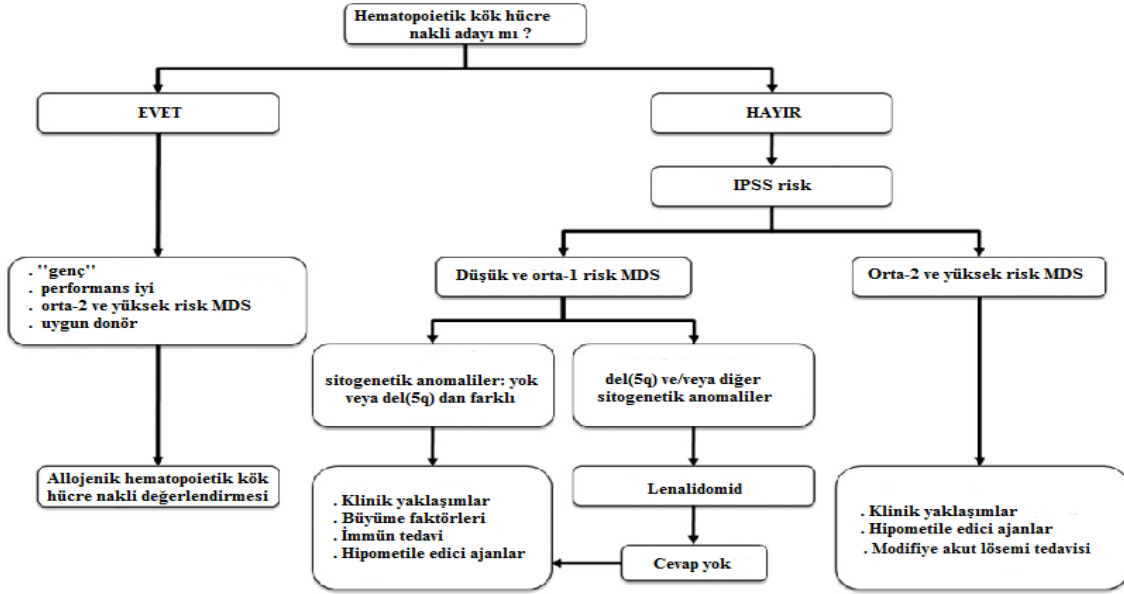
AML'de metilasyon mekanizmasının daha iyi anlaşılması için yapılan çalışmalarla, HIC1 SOCS-1, p73, RAR β 2, CRBP1 ve DAPK1 gibi genlerde de farklı oranlarda metillenme olduğu belirlenmiştir (182, 213-216)

2.8. Myelodisplastik Sendromda Tedavi

MDS, heterojen bir yapıya sahip olduğu için tüm hastalara uygulanan rutin bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Uygun tedavi yaklaşımları hasta (performans durumu, yaş, maliyet ve tercih) ve hastalık ilişkili faktörlere (sitogenetik durum, periferik sitopeninin düşme durumu, hastalığın alt tipi, IPSS/WPSS skoru ve kemik iliğindeki myeloblast) bağlı olarak belirlenmektedir (217).

Risk grupları hayatta kalım ve AML'ye progresyona göre hastaların sınıflandırılmasını mümkün kıldığı için tedavide en önemli nokta hastalığın risk sınıflamasıdır. MDS hastalarının düşük riskli (RA, RARS, RCMD) ve yüksek riskli (RAEB-1, RAEB-2) olmasına göre tedavi yaklaşımları değişiklik göstermektedir. Düşük riskli MDS'de prognoz ve tedavi daha heterojendir ve tedavide çoğunlukla kan yapımını uyarıcı ajanlar kullanılmaktadır. Düşük risk MDS'de tedavi hedefleri arasında hematolojik iyileşme, transfüzyon bağımsızlığı, yaşam kalitesinin iyileşmesi ve progresyonun geciktirilmesi bulunmaktadır.

MDS'de öncelikli tedavi hedefleri, AML'ye progresyonun önlenmesi veya geciktirilmesi, hayatta kalımın uzatılması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesidir. MDS'de hematopoietik fonksiyon bozukluğu probleminin çözümünde, kan hücresi üretiminin stimüle edilmesi için değişik büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Bu ajanların proliferasyonu stimüle etme, apoptozisi bloke etme ve hem normal hematopoietik hücrelerin hem de prelösemik hücrelerin hayatta kalımını destekleme potansiyelleri bulunmaktadır (218).



Şekil 2. 18. Myelodisplastik sendromda için tedavi algoritması (217)

MDS'de uygulanan tedavi alternatifleri arasında destekleyici bakım, hematopoietik büyüme faktörleri, immün baskılayıcı terapiler (IST), allojenik kök hücre transplantasyonu (alloSCT) ve epigenetik tedavi yaklaşımları bulunmaktadır.

2.8.1. Destekleyici Bakım

MDS hastalarının büyük çoğunluğu için tedavi hedefleri arasında, anemide iyileşme sağlamak, sürekli ve tekrarlayan enfeksiyonları kontrol altına almak, aşırı berelenme ve kanamayı kontrol altına almak, yaşam kalitesini iyileştirmek ve hayatta kalma süresini uzatmak bulunmaktadır. MDS'li çoğu hastada anemi görülmesi nedeniyle eritrosit transfüzyonları, trombositopeni tedavisi için trombosit transfüzyonları yapılmaktadır. Sık transfüzyon yapılan hastalarda demir yüklenmesi oluşabileceği için demir şelasyonu yapılmasına gerek duyulmaktadır. Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) ile birlikte ya da tek başına eritropoietin gibi hematopoietik büyüme faktörleri kullanılmaktadır (218). Sürekli ya da tekrarlayan enfeksiyonlarla mücadele etmek için profilaktik antibiyotikler de destekleyici bakım alternatifleri içinde bulunmaktadır.

2.8.2. İmmüsupresif Tedavi

MDS tedavisinde antitimosit globulin (ATG) ve siklosporin gibi immün sistemi baskılayan ilaçlar, düşük risk grubunda, transfüzyon bağımlı MDS hastalarında ve 5q delesyonu olan hastalarda kullanılmaktadır.

Lenalidomid, RBC (red blood cell) transfüzyon bağımlı, IPSS'e göre düşük veya orta-1 risk MDS ve del(5q) sitogenetik anomalisi taşıyan (başka anomalilerle birlikte veya değil) hastalarda anemi tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış ikinci jenerasyon immünmodülatör bir ajandır (219, 220).

2.8.3. Allojenik Hematopoitik Kök Hücre Transplantasyonu

Allojenik hematopoitik kök hücre transplantasyonu (AlloSCT), sağlıklı vericiden alınan hematopoitik kök hücrelerin, alıcıya yüksek doz kemoterapi sonrası verilmesidir. Vericinin kemik iliğinden ya da periferik kanından toplanan kök hücreler kan bankasında işleminden geçtikten sonra hastaya aynı gün içinde ve dondurulmadan kateter yoluyla infüze edilmektedir.

Hastaların çok azı allojenik kemik iliği transplantasyonu ile tedavi edilebilmekte, bunların %40'ında hayatta kalım görülmektedir. AlloSCT hala bilinen tek potansiyel küratif tedavi olsa da ilerleyen yaş, medikal komorbiditeler ve uygun kök hücre donörü bulunabilirliği gibi kısıtlamalar nedeniyle az sayıda hastada uygulanabilmektedir (64).

Allojenik kök hücre nakli uygulanamayan birçok hasta için uygun olan tedavi sıralaması ve kombinasyonlarının seçimine nasıl karar verilmesi gerektiği, yeni keşfedilen genetik ve epigenetik lezyonların prognostik/prediktif modellerle nasıl örtüştürülebileceği gibi sorulara hala tam anlamıyla cevap verilememektedir.

2.8.4. Epigenetik Tedavi Yaklaşımları

Epigenetik deregülasyonun kanser dahil olmak üzere birçok hastalığın gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Anormal DNA metilasyonunun MDS'nin de içinde bulunduğu hematolojik malignitelerde kritik bir moleküler oluşum olarak görülmesi ve aynı zamanda

hematoloji ve onkolojide genetiğin aksine epigenetik değişimlerin farmakolojik olarak geri dönüştürülebilir olmasından yola çıkılarak yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır. Klinikte kullanılan epigenetik olarak aktif iki temel ilaç sınıfı bulunmaktadır (221). Bunlar histondeasetilaz (HDAC) ve DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleridir. Kutanöz T hücreli lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanan, histon asetilasyonunu hedefleyen iki bileşik suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Zolinza) ve romidepsin (Istodax) bulunmaktadır. Değişik kanserlerin tedavisinde kullanılması muhtemel birçok HDAC inhibitörü ise klinik test aşamasındadır. Diğer epigenetik ilaç sınıfı olan ve DNA metilasyonunu hedefleyen DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörleri hipometile edici ajan olarak da bilinmektedir.

2.8.4.1 Hipometile Edici Ajanlar

MDS tedavisinde kullanılmak üzere ilk olarak 2004 yılında, 1960lar'dan beri kimyasal olarak sentezlenen, DNMT inhibitörü ve nükleozid analogu olan 5-azasitidin (Vidaza) ve ardından 2006'da 5-aza-2-deoksisitidin (Decitabine, Dacogen) tüm MDS alt tiplerinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır (222).

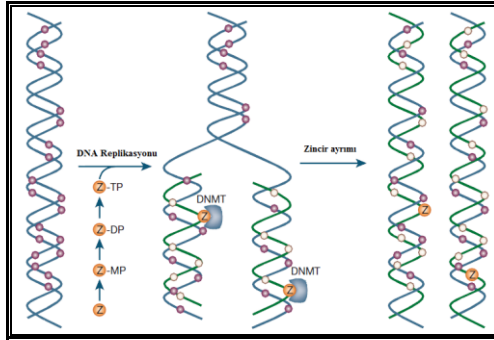
Hipometile edici ajanların kullanımı yüksek riskli MDS veya çoklu serili AML'de ayakta tedavide alternatif bir yaklaşım olarak görülmektedir ve nispeten düşük toksisiteye sahiptir. Buna rağmen tüm remisyon oranları %5-20 iken, hastaların klinik tablolarında hemoglobin, platelet ve nötrofil sayılarında dikkate değer iyileşme ve hayatta kalım görülmektedir (223). Düşük doz hipometile edici ajanların MDS ve sekonder AML'de kullanımı dikkate değer bir etki yaratmıştır.

5-azasitidin, eritrosit transfüzyon bağımlılığını ve AML'ye transformasyon riskini azaltmakta, hayat kalitesini düzeltmekte, destekleyici bakım tedavisiyle kıyaslandığında ortalama hayatta kalımı uzatmaktadır (224, 225).

2.8.4.2. Hipometile Edici Ajanların Etki Mekanizması

CpG promotor bölgelerindeki sitozinin DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen anormal metilasyonu ile normal hücre büyümesi ve farklılaşmasındaki kritik bileşenler susturulmaktadır. In vitroda azanükleozidlerin kullanımı transforme myeloid hücre

hatlarının ılımlı farklılaşması ile sonuçlanmakta, in vivoda ise düşük dozda kullanılan bu ajanlar malignan myeloid hücrelerde DNA demetilasyonunu indüklemektedir. Nükleozid analogu, DNMT inhibitör rolü ile metilasyon gibi patojenik epigenetik olayları geri dönüştürme potansiyeline sahip 5-azasitidin, DNA bazına benzer bir yapı göstermekte ve replikasyon sırasında yeni sentezlenen zincirin yapısına katılmaktadır. DNA'nın yapısına katılan bileşiklerle DNMT'nin aktif bölgeleri arasında kovalent bağlar kurulmakta, enzimin aktif hale geçmesi engellenerek yeni sentezlenen zincirin hipometile olması sağlanmaktadır (226, 227). Bu etki mekanizmasıyla hipometile edici ajanların tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu yeniden düzenlediği düşünülmektedir (90). Aynı zamanda kemik iliğindeki anormal hematopoietik kök hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermektedir (228, 229). MDS ve AML hastalarında 5-azasitidin ve 5-aza-2-deoksisitidin gibi hipometile edici ajanların terapötik aktiviteleri birçok çalışma ile gösterilmiştir (90, 230, 231) ancak ilaçların bu aktiviteyle ilgili mekanizmaları tam olarak anlayamamıştır.



Şekil 2. 19. Hipometile edici ajanların etki mekanizması (89)

2.9. MDS ve AML'de Genom Boyu Analizler

Model organizma genom projelerinin ve özellikle insan genom projesinin sonuçlanmasının yanında mikrodizin ve yeni nesil dizileme yaklaşımları gibi yüksek işlem hacimli (high-throughput) analiz teknolojilerinin geliştirilmesi genom ebadında çalışmalara ciddi bir ivme kazandırmıştır. Kalp damar hastalıkları, Alzheimer, diyabet ve kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın oluşum ve ilerleme sürecinde meydana gelen değişimlerin global anlamda analizini mümkün kılan genom ebadında yaklaşımlar hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmayı açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Myelodisplastik sendrom ve akut myeloid lösemi gibi geniş biyolojik ve klinik heterojeniteye sahip hastalıklarda heterojenitenin teşhis ve tedaviyi zorlaştırdığı göz önüne alındığında hastalık biyolojisinin daha iyi anlaşılması, hastalık alt tipine özgü tedavilerin geliştirilebilmesi ve klinikte uygulanabilmesi için çoklu genomik yaklaşımların kullanıldığı çalışmalardan elde edilecek verinin önemi ve gerekliliği de açığa çıkmaktadır. Bu çerçevede MDS ve AML'de mikrodizin teknolojilerinden yararlanarak transkriptom profilinin çıkarıldığı gen ekspresyon çalışmaları (232, 233), mikrodizin ve yeni nesil sekanslama teknolojilerinin birlikte kullanılarak elde edilen verilerin entegre edildiği genom ebadında metilasyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında demetile edici bir ajan olan *5-azasitidin*'in MDS ve MDS- AML hastalarında metilasyon profili üzerine etkisi araştırıldığı için çalışmamıza benzer nitelikte deneysel tasarımına sahip, genom ebadında analiz yapmayı mümkün kılan teknolojilerin kullanıldığı ve hipometile edici ajanların AML hücre hattı ya da doğrudan MDS ve AML hastalarındaki etkilerini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar bu bölümde karşılaştırmalı olarak anlatılacaktır.

MDS ve AML'de bazı genlerin metilasyonla susturulmuş olmasının keşfi sonrasında demetile edici ajanların alternatif bir tedavi olarak kullanımı gündeme gelmiş ve bu ilaçlar tedavi protokolüne girmiştir. Schmelz ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında demetile edici bir ajan olan *5-aza-2-deoksisitidin*'in AML hücre hattı modelinde gen ekspresyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçlamıştır. *AML hücre hattı* OCI-AML2'ye 5-aza-2-deoksisitidin uygulaması sonrasında mikrodizin teknolojilerinden faydalanarak gen ekspresyon profilinin çıkarıldığı çalışma sonucunda demetile edici ajanın *81 gende ekspresyonu indükleme, 91 gende ise ekspresyonu azaltma* yönünde etki gösterdiği tespit edilmiştir. Ekspresyon değişimi belirlenen bu genler hücre döngüsü kontrolü, farklılaşma, transkripsiyon faktörleri, hücre adezyonu, apoptozis, sitokin sinyali, stres cevabı ve metabolizma başlıkları altında sınıflandırılmaktadır. Mikrodizin analizinden elde edilen verinin validasyonu için 2 kat ve üstünde değişim gösteren genler içinden rastgele seçilen 10 genin 5-aza-2-deoksisitidin uygulaması sonrasında ekspresyonu real time ile çalışılarak sonuçlar doğrulanmıştır. 5-aza-2-deoksisitidin mekanizması hakkında detaylı bilgi etmek amacıyla ajan tarafından indüklenen genlerden rastgele seçilen RPGR, CD14, PTPN22, calgranulin ve MPO genlerinin metilasyon durumları araştırılmış bunlardan sadece MPO geninin 5' bölgesinde metilasyon görülmüştür (234).

Mikrodizin teknolojisi kullanılarak transkriptom profilinin çıkarıldığı bu çalışma sonrasında aynı yıl Mund ve arkadaşlarının *5-aza-2-deoksisitidin*'in genomik metilasyon paterni üzerindeki etkilerini araştırdığı çalışmaları yayınlanmıştır. Bu çalışmada ise önceki çalışmadan farklı olarak doğrudan **7 MDS hastasından** ilk teşhis, tedavi süreci ve tek kür tedavi sonrasında olmak üzere toplam 34 kemik iliği aspiratından elde edilen DNA kullanılarak kapiller elektroforez ile metilasyon seviyesi belirlenmiştir. Genomik DNA'da bulunan 5-metilsitozinin kantifikasyonunu sağlayan bu teknik DNA'nın enzimatik hidrolizinin ardından elde edilen tek nükleotidlerin floresan markırla muamele edildikten sonra kapiller elektroforezde ayrılması esasına dayanmaktadır. Çalışmaya dahil edilen 7 hastanın 5'inde ilaç tedavisinin %70'in üzerinde demetilasyon sağladığı görülmüştür. İlacın genom ebadında aktivitesini ilk kez gösteren bu çalışmada elde edilen sonuçlar demetile edici ilaçlarla tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli olabilecek yeni 5-aza-2-deoksisitidin aracılı demetilasyon hedefleri ortaya çıkarmıştır. p21'in bu hedeflerden biri olduğu görülmüştür (235).

Myeloid hastalıklarda antitümörjenik etkiye sahip olduğu bilinen 5-aza-2-deoksisitidin ve histon deasetilaz inhibitörü olan SAHA'nın transkriptom değişimlerini nasıl yönlendirdiği konusu henüz tam anlamıyla aydınlatılmamıştır. Bu noktadan yola çıkılarak 2007 yılında Desmond ve arkadaşları *5-aza-2-deoksisitidin* ve *SAHA*'nın myeloid hastalıklarda transkriptom üzerine global etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarında ilaç muamelesi sonrası **AML hücre hattı** KG-1'de mikrodizin ile genom ebadında ekspresyon analizi yapmıştır. Analiz sonucunda ilaç muamele edilen ve edilmeyen iki grubun kıyaslanması ile 3837 farklı eksprese olan prob set belirlenmiştir. KG-1 hücreleri erken myeloid progenitör hücreler oldukları için bu hücre hattının ekspresyon seviyesinin normal CD34+ hematopoietik kök hücre popülasyonu ile karşılaştırılması uygun görülmüş, karşılaştırma ile normal CD34+ hücrelerde eksprese olan 5' regülatör bölgesinde CpG adacığı bulunduran 39 gen tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında değişik karyotipe sahip **120 AML hastasında** t(8;21), t(15;17), inv16, 11q23/MLL, kompleks ve normal karyotip olmak üzere her gruptan 20 hasta dahil edilerek tespit edilen 39 genin ekspresyon seviyeleri belirlenmiş, bunlar içinden GAS2L1, TFIIS, EHD3, DRAL, Enolase 2, MX1, ASTML, PXDN genlerinin ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür. Bisülfid sekanslama teknolojisi ile KG-1 hücre hattında ve 3 AML örneğinde 5' regülatör bölgenin metilasyon analizi yapılmış, herhangi bir CpG metilasyonu belirlenmemiştir (236).

İlerleyen yıllarda ise yine hipometile edici bir ajan olan, MDS ve AML hastalarında terapötik etkisi bilinen *5-azasitidin'in valproik asit ve all-trans retinoik asit* (ATRA) gibi ilaçlarla kombine edilerek kullanımının hastalar üzerindeki etkileri klinik ve güvenlik açısından değerlendirildiği bir çalışma gerçekleştirilmiştir. **53 yüksek riskli MDS ve AML** hastasının dahil edildiği bu çalışmada ise global metilasyon belirteci olan *LINE assay* kullanılarak metilasyon seviyesi belirlenmiştir. 5-azasitidin'in metilasyonu önemli ölçüde azalttığı ancak hipometilasyonun tedaviye yanıt veren ve vermeyen hastalar arasında farklılık göstermediği tespit edilmiştir (237). 5-aza-2-deoksisitidin'in transkriptom ve metilom üzerindeki etkilerini değerlendiren önceki çalışmalardan (235, 236) farklı olarak bu çalışmada uygulanan kombine tedavi yaklaşımının hastaların klinik tablosu üzerindeki etkisi ve tedavi yanıtlarının da ayrıntılı olarak değerlendirilmiş olması yönünden elde edilen veriler önemlidir.

5-aza-2-deoksisitidin'in hücre hattı modelinde transkriptom üzerine etkisini değerlendiren bir başka çalışma ise Serrano ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Genetik lezyonların değişen gen ekspresyon paternine neden olduğu bilgisinden yola çıkılarak planlanan bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak bu kez 5-aza-2-deoksisitidin'in gen ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması yanında, AML'de en yaygın görülen kromozomal lezyonlar olan t(8;21) ve inv(16)'nin oluşturduğu füzyon proteinlerinin lökomojenik mekanizmasının da daha iyi anlaşılması amaçlanmıştır. AML'de de en yaygın görülen t(8;21) ve inv(16) kromozomal lezyonları AML1, ETO, CBF β ve MYH11 gibi önemli genlerin bulunduğu kromozom bölgelerini etkilemekte ve bu durum AML1-ETO, CBF β -MYH11 gibi füzyon proteinlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Kromozomal lezyonların oluşturduğu anılan füzyon proteinlerinin transkriptom üzerine etkisini belirlemek amacıyla Kasumi-1 hücre hattı AML1-ETO füzyon geni taşıyan U937 hücre hattı ve t(8;21) ve inv(16) lezyonları taşıyan örnekler kullanılarak transkriptom analizi yapılmıştır. Aynı zamanda ilişkili epigenetik lezyonların etkisini değerlendirmek üzere Kasumi-1, U937t, U937AE hücreleriyle inv(16) taşıyan hastadan elde edilen hücrelere *5-aza-2-deoksisitidin* ve *histon deasetilaz inhibitörü* uygulanarak transkriptomları analiz edilmiş ve lösemik süreçte susturulan genlerin tanımlanması hedeflenmiştir. Çalışma sonucunda lökomojenik süreçte deregüle olan 156 genden 59'unun demetile edici ajan ve HDAC inhibitörleri ile gerçekleştirilen tedavi ile normal ekspresyon seviyelerine ulaştıkları görülmüştür. Bu genlerin AML'de kromatinin yeniden düzenlenmesinde rol oynadıkları vurgulanmıştır. Yine aynı çalışma kapsamında **16 AML hastası** ile yapılan

transkriptom analizi hastaların genetik yapısı ile transkriptomlarının korele olduğunu göstermiştir (238).

Myeloid hücre hattı modelinde 5-aza-2-deoksisitidin indüksiyonu ile global metilasyon ve gen ekspresyonu değişimlerinde rol oynayan anahtar yolları tanımlamayı amaçlayan diğer bir çalışmada ise önceki çalışmalardan farklı bir hücre hattı olan **HL60**'a **5-aza-2-deoksisitidin** uygulandıktan sonra apoptotik etki, genom boyu metilasyon ve gen ekspresyon profilleri belirlenmiştir. Metilasyon ve transkriptom analizlerinin mikrozidin teknolojisi ile yapıldığı çalışma sonucunda 5-aza-2-deoksisitidin'in uygulamasının global DNA metilasyonunu azalttığı görülmüştür. Entegre analizlerle, 5-aza-2-deoksisitidin aracılığıyla demetilasyon ve ekspresyon artışı görülen, çoğunluğu gelişim ve farklılaşma yollarında bulunan 160 gen tanımlanmıştır. 5-aza-2-deoksisitidin'in hücrelerde apoptozisi indüklediği görülmüş ve apoptozis ile ilişkili genler üzerine yoğunlaşarak, proapoptotik bir gen olan DAPK1'e ek olarak BCL2L10 da 5-aza-2-deoksisitidin hedefi olarak tanımlanmıştır. İleriki aşamada **58 MDS**, **44 de novo AML** ve **42 terapi ilişkili myeloid neoplazili** (t-MN) hasta olmak üzere toplam 144 hasta örneğiyle çalışılarak BCL2L10 geninin AML'de en sık anormal metilasyon gösteren genlerden biri olduğu gösterilmiştir. Hipometile edici ajan tedavisi ile indüklenen metilasyon ve ekspresyon değişimlerinin kompleks olduğunu vurgulayan çalışmada epigenetik tedavinin farklılaşma ve apoptozis gibi önemli yolları etkilediği gösterilmiştir (239).

2009 yılında Jiang ve arkadaşlarının MDS'den AML'ye dönüşümdeki moleküler mekanizmayı açıklamak üzere yaptıkları çalışmalarına kadar geçen süreçteki araştırmalar çoğunlukla hipometile edici ajanların etkileri üzerine odaklanmıştır. **184 MDS veya AML hastası** ve 6 farklı lösemi hücre hattının kullanıldığı çalışmada anormal DNA metilasyonu ve kromozomal aberasyonları mikrodizin teknolojilerinden yararlanarak tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında DNA metilasyon mikrodizinleri kullanılarak 807 genin 5' düzenleyici bölgelerinden seçilmiş 1505 CpG adacığı taranmıştır. Yapılan analizler sonucunda klinik tabloyla korelasyon gösteren bulgular elde edilmiştir. Aynı zamanda çalışmaya dahil edilen örneklerin karyotipleri SNP mikrodizinler kullanılarak belirlenmiştir. Hastalığın değişik basamaklarında gerçekleştirilen metilasyon ve kromozomal aberasyon belirleme çalışmaları anormal DNA metilasyonunun hem MDS'den AML'ye geçişte tümör baskılayıcı genlerin susturulması açısından hem de klonal varyasyon için önemli olduğunu ortaya koymuştur (240).

5-aza-2-deoksisitidin'in tedavi amaçlı kullanıldığı AML hastalarında genom ebadındaki aktivitesini belirlemek üzere gerçekleştirilen diğer kapsamlı bir çalışmada ise **16 AML** hastasından *tedavi öncesinde ve tek kür 5-aza-2-deoksisitidin tedavisi sonrasında* kemik iliği örneği toplanmış ve metilli DNA üzerinden yapılan yeni nesil sekanslama çalışmasıyla DNA metilasyon profili çıkarılmıştır. 5-aza-2-deoksisitidin'in promotor, CpG adacık gibi genomik bölgeler dahilinde metilasyon profili üzerine etkisini değerlendirmek için tedavi öncesi ve tedavi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı metilasyon farkı gösteren (DMR-Differentially Methylated Region) bölgeler tanımlanmıştır. Aynı zamanda CDKN2B, HIST1H2AA ve GAPDH olmak üzere daha önce metilasyon değişiminin rapor edildiği üç genin çalışmaya dahil edilen hasta profilindeki değişimi de araştırılmıştır. CDKN2B tedavi öncesi örneklerden sadece birinde, HIST1H2AA geninin ise tüm tedavi öncesi örneklerde metile olduğu görülmüştür. Housekeeping bir gen olan GAPDH'de ise örnekler arasında anlamlı bir metilasyon farklılığı tespit edilmemiştir. Bu genler haricinde Figueroa ve arkadaşlarının yaptığı çalışma referans alınarak hayatta kalımın öngörülmesinde sınıflayıcı olduğu belirtilen 15 genin de metilasyon durumu değerlendirilmiş bunlar içinden sınıflayıcı olan SMG6, SRR, E2F1, BLR1 (CXCR5), LCK genleri hipometile, BTBD3 ve NYNRIN genleri hipermetile bulunmuştur. Sonuç olarak yüksek işlem hacimli sekanslama yaklaşımlarını kullanarak genom ebadında 5-aza-2-deoksisitidin aracılı metilasyon değişimlerinin ilk kez çıkarıldığı bu çalışmada hipometile edici ajanın tedavi sonrası kemik iliğinde metilasyon değişimlerini önemli ölçüde indüklediği gösterilmiştir (241).

Aynı yıl yayınlanan başka bir çalışmada ise *düşük riskli MDS*'de hastalığın oluşum sürecinde değişen metilasyon ve ekspresyon profili belirlenmeye çalışılmıştır. Del Rey ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında **83 düşük riskli MDS** hastası ve **36 sağlıklı kontrolün** kemik iliği üzerinden mikrodizin ile metilasyon ve gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. Düşük riskli MDS hastalarında 552 farklı metilasyon gösteren CpG lokusu tanımlanmış, hipermetile genlerin hipometile genlerden daha sık olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda mRNA ekspresyon profillemesi ile düşük riskli MDS ve sağlıklı kontrol arasında 1005 genin ekspresyonunda anlamlı fark olduğu belirlenmiştir. Epigenetik ve ekspresyon profillerinin entegre analizi düşük riskli MDS grubunda hipermetile genlerin % 66.7'sinin ekspresyonunda azalma olduğunu ortaya koymuştur. Yine düşük riskli MDS grubunda apoptozis yolağını da içeren değişimlerin moleküler mekanizmayla ilişkili, iki apoptotik gen olan BCL2 ve ETS1 genlerinin ise

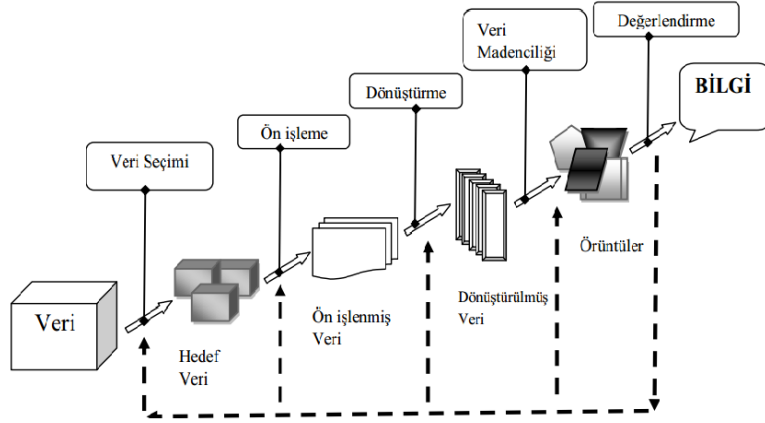
susturulmuş olduğu bulunmuştur. İmmün cevap ve RNA biyogenezinin de hipermetilasyondan etkilendiği, IL27RA ve DICER1 genlerinin ekspresyonunda azalma olduğu da çalışmanın bulguları arasındadır. Epigenetik ve ekspresyon çalışmalarının entegrasyonunu da kapsayan bu çalışmada sonuçlar düşük riskli MDS hastalarında anormal epigenetik regülasyonun hastalıkta merkezi role sahip önemli bir özellik olduğunu ortaya koymuştur (242).

Bugüne dek MDS ve AML’de tedavi amaçlı kullanılan hipometile edici ajanların gerek transkriptom gerekse metilasyon profili üzerinde etkilerini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmış, hangi genlerin bu süreçte etkili olduğu, değişen metilasyon profilinin gen ekspresyonu üzerinde nasıl bir etki gösterdiği gibi sorulara cevaplar aranmış kullanılan materyal ve tekniklerin mümkün kıldığı ölçüde bu sorular kısmen cevaplanabilmiştir.

2.10. Genomboyu Çalışmalarda Biyoinformatik Analiz ve Veri Madenciliği

Biyoinformatik, bilgisayar bilimleri ve biyoistatistik ile biyoloji, biyokimya, tıbbi biyoloji, genetik ve fizyoloji gibi biyomedikal bilimlerin birleşiminden oluşan disiplinler arası bir çalışma alanıdır. Bu bilim alanında, özellikle genetik veri setleri olmak üzere büyük biyolojik veriler kullanılarak matematik, istatistik ve bilgi teknolojileri eşliğinde biyolojik soruların çözümlenmesine yönelik ileri analizler gerçekleştirilmektedir.

İnsan genom projesinden elde edilen veriler yanında birçok model organizmanın da genom dizisinin belirlenmesi genom ebadında analizlere ciddi bir ivme kazandırmıştır. Mikrodizin ve yeni nesil sekanslama teknolojileri gibi işlem hacmi yüksek tekniklerin kullanımı ile elde edilen verinin analizinde veri madenciliği (VM, Data Mining) yöntemleri bu noktada araştırmacıların en büyük yardımcısı haline gelmiştir. Son yıllarda çok boyutlu verilerde veri madenciliği yaklaşımlarına sıklıkla başvurulmaktadır. Elde edilen verileri doğru ve yansız biçimde analiz edebilecek istatistiksel modellerin kullanımı da büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2. 20. Bilgi keşfi sürecinde veri madenciliği (243)

Yüksek ölçekli genetik çalışmalardan elde edilen ham veri setinde gizlenmiş biyolojik anlamın ortaya çıkarılması ve verinin bilgiye dönüştürülmesi biyoinformatik analizler ve veri madenciliği yaklaşımları ile mümkün olmaktadır.

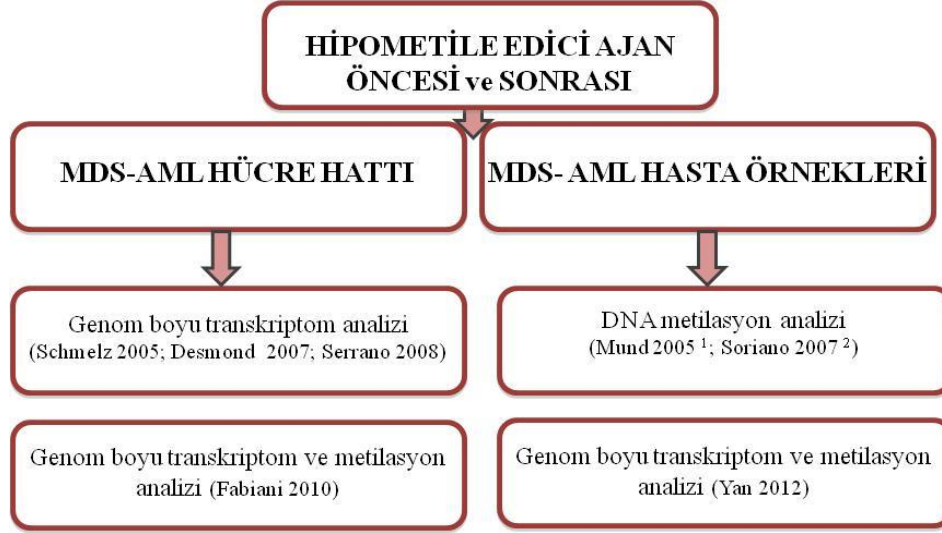
3. GEREKÇE VE AMAÇ

Myelodisplastik sendrom, kemik iliğinde inefektif hematopoiezis sonucunda periferik kanda sitopenilerin (değişik derecelerde ve kombinasyonlarda anemi, nötropeni ve/veya trombositopeni) görüldüğü klonal hastalıkların heterojen bir grubudur. MDS, sitogenetik, moleküler ve epigenetik değişimlerin etkisiyle klonal gelişim gösteren çok faktörlü ve çok basamaklı bir patogeneze sahiptir. MDS'nin patogeneze ait moleküler mekanizmanın aydınlatılmasında yol gösterici nitelikte ve önemli katkılar sağlayan pek çok araştırma ile hastalıkla ilişkili moleküler değişimler tespit edilmiştir.

MDS'de hastaların klinik açıdan geniş ölçüde değişkenlik göstermesi gerek hastalık teşhisini gerekse alt grupların birbirinden ayrımını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle teşhis için morfolojik ve sitogenetik farklılaşmanın ötesinde hastaların transkriptom, genom ve metilomlarının da çalışılması ve bu amaçla yapılacak tüm genetik ve epigenetik analizlerde gelişen teknolojiye paralel olarak yüksek işlem hacimli, genom ebadında analiz yapmayı mümkün kılan yeni tekniklerin uygulanması önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir.

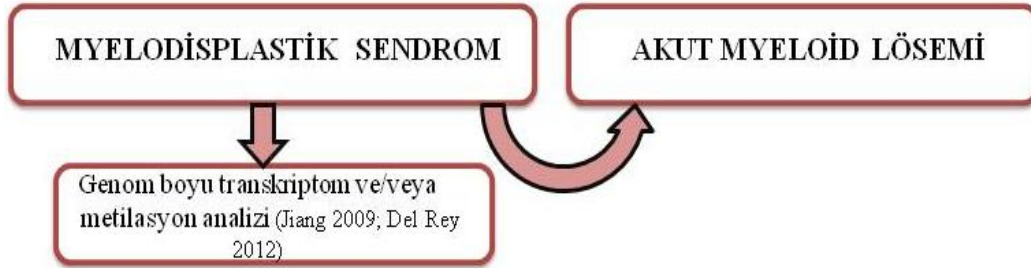
MDS oluşumunda da önemli bir bileşen olan epigenetik değişimlerin malignant gelişimdeki öneminin daha iyi anlaşılması ve epigenetik değişimlerin geri dönüştürülebilir olması onları terapötik yaklaşımlarda ilgi çekici bir hedef haline getirmiştir. Epigenetik regülasyondan sorumlu ve deregülasyona neden olan bölgelerin tanımlanması demetile edici ajanların ve histon deasetilaz inhibitörlerinin kanser de dahil olmak üzere epigenetik temele sahip hastalıkların tedavisinde kullanımını gündeme gelmiştir.

5-azasitidin ve 5-aza-2-deoksisitidin gibi hipometile edici ajanlar MDS ve AML tedavisinde kullanılmaya başlandıktan sonra DNA metiltransferaz inhibitörü olan ilaçlara yönelik ivme kazanan çalışmalarda hipometile edici ajanların etki mekanizması ve hedefleri sorgulanmış, gerek MDS ve AML hücre hatlarında gerekse MDS ve AML hastalarında transkriptom ve metilasyon üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar Şekil 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3. 1. MDS ve AML’de hipometile edici ajanların etkisini araştıran genom boyu metilasyon ve transkriptom çalışmalarının özeti
¹kapiller elektroforez ile, ²LINE metilasyonu

MDS ve AML’de hipometile edici ajanların etkisi yanında doğrudan hastalık sürecinde değişen gen ekspresyon ve metilasyon paternini belirlemek üzere de çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. MDS’de metilasyon profilini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların özeti

Çizelge 3. 1. Tez çalışması ve benzer yayınların karşılaştırılması

	Tez çalışması	Yan et al.	Rey et al.
Hasta profili	MDS, MDS transforme AML	AML	Düşük riskli MDS
Kullanılan hipometile edici ajan- örnek alma zamanı	5-azasitidin tedavisi öncesi ve sonrası	5-aza- 2-deoksisitidin tedavisi öncesi ve sonrası	Tedavi yok
Kür	4 kür	Tek kür	
Metilasyon analizinde kullanılan teknoloji	Nimblegen 2.1 deluxe promotör array	Yeni nesil dizileme	12 K CpG array
Ekspresyon analizi	QRT-PCR ile hedef genlerin ekspresyon analizi		Mikrozidin ile genom boyu ekspresyon analizi

Konuyla ilgili bugüne dek yapılan araştırmalara bakıldığında çalışmamıza benzerlik gösterenler bulunmakla birlikte aşağıda detayları verilen nedenlerden dolayı çalışmamız özgünlük arz etmektedir.

- Hipometile edici ajanların transkriptom ve metilasyon değişimleri üzerindeki etkilerini inceleyen Şekil 3.1’de özetlenen çalışmalarda sıklıkla demetile edici ajan olarak **5-aza-2-deoksisitidin**’in kullanıldığı dikkat çekmektedir. Aynı zamanda ajanın etkisi tek kür uygulamadan sonra değerlendirilmektedir (241). Bununla birlikte hipometile ajanın tek başına kullanımının etkisinin yanında **histondeasetilaz inhibitörü gibi başka ilaçlarla kombine edilerek** kullanımının etkinliği ve etkisi de sorgulanmıştır (236-238). Bu noktada çalışmamızda hipometile edici ajan olarak **5-azasitidin** kullanılmış (sadece hipometile edici ilaç tedavisi) ve hastalardan tedavi öncesinde ve **4. kür tedavi sonrasında** örnek alınmıştır.
- Yapılan çalışmalarda önemli bir diğer konu da kullanılan materyallerdir. Araştırmalarda çoğunlukla **myeloid hücre hatlarının** tercih edilmesi ve bu hücre hatlarının primer tümör hücrelerini birebir yansıtamıyor olması da önemli bir eksiklik olarak göze çarpmaktadır. Hücre hatları yanında hasta örneklerinin de çalışmaya dahil edildiği araştırmalarda ise bu örnekler çalışmanın ileriki aşamalarında elde edilen verilerin validasyonu için kullanılmıştır. Tabii ki doğrudan hasta örnekleri üzerinden gerçekleştirilen çalışmalar da bulunmaktadır.

Bunlarda ise sitogenetik anomaliye sahip AML hastaları, de novo AML hastaları ya da düşük riskli MDS hastalarının çalışmaya dahil edildiği görülmektedir. Çalışmamızda **MDS (RAEB-1 ve RAEB-2–yüksek riskli MDS) ve MDS'den AML' ve dönüşüm gösteren** hastaların kullanılması da ayırıcı bir özelliktir.

- MDS ve AML'de genom boyu analizler başlığı altında bahsedilen iki araştırma yaklaşım ve amaç itibarıyla çalışmamıza benzemekle birlikte hasta profili ve kullanılan teknolojiler bakımından farklılık arz etmektedir (Çizelge 3.1). Yan ve arkadaşlarının çalışmasında *sitogenetik anomaliye sahip AML* hastalarında *tek kür* 5-aza-2-deoksisitidin tedavisinin etkisi yeni nesil sekanslama teknolojisi ile incelenmiştir. Del Rey ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise *düşük riskli MDS* hastalarında 12K CpG mikrozidini ile metilasyon ve ekspresyon mikrodizini ile transkriptom profili çıkarılmıştır. Çalışmamızda metilasyon analizleri için kullanılan **Nimblegen 2.1 deluxe promotor arrayler** daha fazla sayıda genomik bölgeyi ve CpG adacığını temsil eden prob bulundurmaktadır.

Çalışmamızda MDS ve MDS kökenli AML tanısı konmuş ve 5-azasitidin tedavisi alması uygun görülen hastalardan tedavi öncesi ve sonrasında ve sağlıklı kontrollerden alınan kemik iliği aspiratlarından izole edilen DNA üzerinden promotor arrayleri kullanarak gerçekleştirilen genom ebadında metilasyon analizi ile **tedavi öncesi ile tedavi sonrası, tedavi öncesi (eşli) örnekler ile sağlıklı kontrol, tedavi öncesi (tek) örnekler ile sağlıklı kontrol, tedavi öncesi (tüm) örnekler ile sağlıklı kontrol,** ve **tedavi sonrası ile sağlıklı kontrollere** ait metilasyon profillerinin karşılaştırılması ile;

- Farklı metilasyon gösteren kromozom bölgeleri ve bu bölgelerde bulunan genlerin tespit edilmesi
- Genler üzerinden gerçekleştirilecek gen ontoloji, zenginleşme ve yolak analizleriyle MDS ve AML patogenezinde önemli olabilecek genlerin ve yolakların belirlenmesi,
- Anormal DNA metilasyonu ile hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan muhtemel genlerin tespit edilmesi
- Farklı metilasyon gösteren kromozom bölgelerindeki genlerden yola çıkılarak yapılacak ileri analizlerle yüksek heterojenite gösteren MDS'nin teşhis ve

tedavisini daha etkin ve başarılı kılacak olan yeni moleküler belirteçlerin tanımlanması

- Belirlenen genler çerçevesinde MDS'den AML'ye transformasyonda rol oynayan mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik moleküler açıklamalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

Tedavi öncesinde ve sonrasındaki metilasyon profillerinin karşılaştırılması ile tedavi öncesinde MDS'de varlığı bilinen anormal metilasyonun hangi gen bölgelerini etkilediği, tedavi amaçlı kullanılan ve global bir hipometile edici ajan olan 5-azasitidin'in hangi bölgelerde metilasyonu geri döndürdüğü de tespit edilecektir.

Tez kapsamında MDS tedavisinde kullanılan 5-azasitidin'in metilasyon profili üzerine etkisinin ortaya konması ve hastalığın altında yatan moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına yönelik önemli verilerin elde edilmesi mümkün olacaktır. Bu bilgiler ayrıca hastalığın teşhis ve tedavisinde yol gösterici olabilecek yeni moleküler belirteçlerin tanımlanabilmesine ve yeni tedavi alternatifleri geliştirilebilmesine önemli katkılar sağlanacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilimdalı, Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden gönüllü onam formu imzalatılan hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan kemik iliği aspirasyonları (30 ml) çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen bireylerden bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınmıştır. Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 08.06.2009 tarih ve 153-4847 karar nolu etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- Çalışmaya katılmayı kabul etmiş olma
- Kemik iliği yetmezliği ön tanısı ile alınan biyopsi örneğinden MDS veya AML tanısı almış olup tedavide 5-azasitidin kullanma endikasyonu bulunma
- Hastaların tedavi protokolünün aynı olması

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri

- Çalışmaya katılmayı kabul etmemiş olma
- Kemik iliği yetmezliği ön tanısı ile alınan biyopsi örneğinden MDS veya AML tanısı dışında bir tanı almış olmak
- Kemik iliği yetmezliği ön tanısı ile alınan biyopsi örneğinden MDS veya AML tanısı almış ancak tedavide 5-azasitidin (VIDAZA) kullanmamış olma

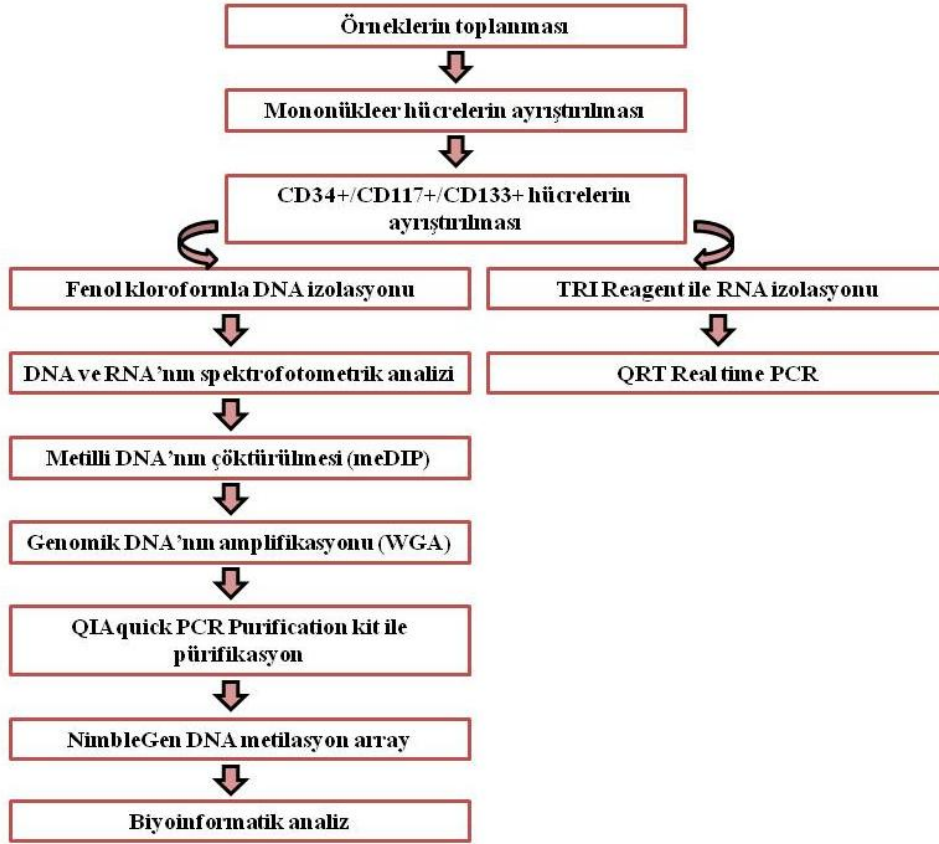
Sağlıklı kontrol seçim kriterleri

- Çalışmaya katılmayı kabul etmiş olma
- 18 yaşından büyük olma
- Kemik iliği donörü olmaya uygun olma ve başka hastalığı bulunmama

Çizelge 4. 1. Çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı kontrollere ilişkin sayısal bilgiler

Örnek numarası	Hastalık	Yaş/ Cinsiyet	% Blast oranı (tedavi öncesi)	Tedavi sonrası örnek alma durumu
11/04	MDS ilişkili AML	64-K	26	-
11/13	MDS ilişkili AML	66-E	20	+
11/14	MDS RAEB II	80-E	10	+
11/15	MDS ilişkili AML/RAEB 2	78-E	12-22	+
11/17	AML	61-K	>20	-
11/22	AML M2	66-K	>20	-
11/23	AML	61-K	70	+
11/24	MDS-RAEB I	41-K	8	+
12/20	AML	80-E	23	+
12/21	AML	75-K	52	-
12/22	MDS-RAEB II	78-E	17	+
12/24	MDS-AML	62-E	>20	-
12/35	MDS-AML-M6	67-E	>20	-
12/36	MDS-AML	78-E	19	+
12/70	MDS-RAEB II	61-E	15	+
12/71	MDS-RAEB II	57-E	10	+
12/72	MDS-RAEB II	78-E	15	-
12/73	MDS-RAEB II	60-E	14	+
12/74	MDS-RAEB II	63-K	16	+
12/75	MDS-RAEB II	55-E	14	-
12/76	MDS RAEB I	E	9	-
12/81	MDS RAEB I	72-E	7	-
12/82	MDS	60-E	1	+
12/83	MDS-RAEB II	63-K	10	-
12/84	MDS-AML	83-E	>20	+
13/01	MDS-KMML	77-K		-
13/02	MDS-AML	E	>20	-
13/25	MDS-AML	K	20	+
13/26	MDS-KMML	72-K	5	+
13/27	MDS-RAEB II	30-K	10	+
13/53	MDS	E		-
13/54	AML	79-E	70	-
13/76	MDS-RAEB II	66-E	12	+
12/78	sağlıklı kontrol	K	-	-
13/29	sağlıklı kontrol	E	-	-
13/75	sağlıklı kontrol	E	-	-
13/85	sağlıklı kontrol	K	-	-
13/271	sağlıklı kontrol	E	-	-

4.2. Yöntem



Şekil 4. 1. Yöntem akış şeması

4.2.1. Kemik İliği Aspirasyonu

Çalışmanın birlikte yürütüldüğü ilgili doktorlar tarafından hastaların kalça kemiğine özel bir iğne ile girilerek (lokal anestezi altında) 30 ml kemik iliği şırınga yardımıyla alındı. PBS + 2 mM EDTA + % 0.5 BSA'dan oluşan solüsyonda muhafaza edildi.

4.2.2. Kemik İliği Aspiratından Mononükleer Hücrelerin Ayrıştırılması

- Kemik iliğiyle 1:1 oranındaki Biocoll (Biochrom, L6115) üzerine, PBS + 2 mM EDTA + % 0.5 BSA'dan oluşan solüsyonla karıştırılmış kemik iliği aspiratı pastör pipetiyle yavaşça damlatıldı.
- 445 g'de 35 dakika santrifüj edildi.
- Pastör pipetiyle aradaki bulutumsu beyaz faz alınarak temiz tüpe aktarıldı.

- Mononükleer hücreler ayrıştırıldıktan sonra bunların içinden hematopoietik kök hücrelerin izolasyonu gerçekleştirildi.

4.2.3. CD34⁺/CD117⁺/CD133⁺ Hematopoietik Kök Hücrelerin İzolasyonu

Lineage Cell Depletion Kit (MACS, 130-092-211) kullanılarak, kit protokolü uyarınca CD34⁺/CD117⁺/CD133⁺ hücreler izole edildi.

4.2.3.1. Manyetik İşaretleme

1. Hücre süspansiyonu 300 g'de 10 dk santrifüj edildi.
2. Süpernatant pipetle atıldı.
3. Her 10⁷ hücre için 40 µl buffer eklenerek hücre peleti kaldırıldı.
4. Her 10⁷ hücre için 10 µl Biotin-Antibody Cocktail eklendi, iyice karıştırılarak 10 dk 4-8 °C'de bekletildi.
5. Her 10⁷ hücre için 500-1000 µl buffer eklenerek hücreler dikkatlice yıkandı ve 300g'de 10 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant pipetle tamamen uzaklaştırıldı. Her 10⁷ hücre için 80 µl buffer eklenerek hücreler dikkatlice kaldırıldı.
7. Her 10⁷ hücre için 20 µl Anti-Biotin MicroBeads eklendi, iyice karıştırılarak tekrar 15 dk 4-8 °C'de bekletildi.
8. Her 10⁷ hücre için 500-1000 µl buffer eklenerek hücreler dikkatlice yıkandı ve 300 g'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant pipetle tamamen uzaklaştırıldı.
10. Hücre peleti 500 µl buffer içinde süspanse hale getirildi.

4.2.3.2. LS Kolonlarla Manyetik Ayrıştırma

1. Uygun MACS seperatöre yerleştirilen manyetik alan içindeki kolon 3 ml buffer ile yıkandı.
2. Hücre süspansiyonu kolona uygulandı.
3. Kolon üç kez 3 ml buffer ile yıkanarak istenmeyen hücrelerin kolonda kalması ve istenen hücrelerin ise elüe edilerek tüpte toplanması sağlandı.

İzole edilen CD34⁺/CD117⁺/CD133⁺ hücrelerin bir kısmı DNA (2/3) bir kısmı da RNA (1/3) izolasyonu için ayrıldı.

4.2.4. Fenol -Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi ile DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar

Sodyum Tris EDTA (STE)

0.1 M NaCl (S5886)

10 mM Tris HCl pH: 8.0 (Sigma T5941)

1 mM EDTA pH: 8.0 (Sigma E5134)

%10'luk Sodium dodecyl sulfat (SDS)

100 g SDS (Scharlau SD0010) 900 ml suda çözdürüldü ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. HCl (Riedel-de Haen, 07102) ile pH metrede (CRISON pH meter Basic 20) pH: 7.2'ye ayarlandı. 0.2 µm çaplı filtreden (Sartorius Minisart) geçirilerek steril edildi.

Sodyum Asetat (Na asetat)

408.1 g Sodyum Asetat (Sigma S2889) 800 ml distile suya ilave edilerek manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific) yardımıyla çözdürüldü. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Asetik asitle pH: 7'ye ayarlanarak otoklavlandı (Hirayama Hiclave HVA-110).

1. Hücrelerin üzerine 500 µl STE, 30 µl %10' luk SDS ve 20 µl Proteinaz K (~20 mg/mL), Fermentas EO0491) ilave edilerek tüpün ağzı parafilm ile kapatıldı. 56°C'ye ayarlanan su banyosunda bir gece inkübasyona bırakıldı.
2. Su banyosundan alınan tüpe 25:24:1 oranındaki Fenol: Kloroform: İzoamilalkol (AppliChem, A0944) karışımından 500 µl ilave edildi. Beyaz renk alıncaya kadar vorteks yardımıyla karıştırıldı. 13000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
3. Tüpün yüzeyinde oluşan üst faz pipetle alınarak temiz bir tüpe aktarıldı. Fenol-kloroform aşaması tekrarlandı.
4. Temiz tüpe alınan süpernatant üzerine 1000 µl %95'lik etanol (AppliChem, A3678) ve 1/10 oranında 3M Sodyum Asetat konuldu.
5. DNA beyaz yumak şeklinde görünür hale gelinceye kadar tüp yavaşça alt üst edildi.

6. Tüpler 4°C'de 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
7. Alkol uzaklaştırıldı.
8. 500 µl %70'lik soğuk etanol eklendi. Pelet halindeki örnek tüpün dibinden kaldırıldı.
9. 4°C'de 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
10. DNA kaybedilmeden alkol uzaklaştırıldı. Tüpün ağzı açık bırakılarak alkolün iyice uçması sağlandı.
11. Kurutma işleminden sonra pelet üzerine peletin büyüklüğüne göre distile su eklenerek 37°C'de 3-4 saat bekletildi. DNA sonra kullanılmak üzere 4°C'de saklandı.

4.2.5. RNA İzolasyonu

1. 5-10 x10⁶ hücre için 1 ml TRI reagent (Sigma, 93289) eklenerek -80'e kaldırıldı. Örnekler -80'den alınarak 5 dk oda ısısında inkübe edildi.
2. 12000g'de 10 dk 4°C de santrifüj edildi ve süpernatant temiz tüpe aktarıldı.
3. Her 1 ml TRI reagent için 100 µl BCP (Sigma, B9673) eklendi. İyice karıştırılarak (15 sn) oda ısısında 5-15 dk inkübe edildi.
4. 12000 g'de 10-15 dk 4°C de santrifüj edilir ve süpernatant temiz tüpe (1.5 ml) aktarıldı.
5. Her 1 ml TRI reagent için 500 µl isopropanol (AppliChem, A3928) eklendi, 5-10 saniye vorteklendi ve oda ısısında 5-15 dk inkübe edildi.
6. 12000 g'de 8 dk 4-25°C'de santrifüj edildi ve süpernatant pelet dağıtılmadan uzaklaştırıldı. Presipite RNA beyaz pelet şeklinde görüldü.
7. 1 ml %75'lik etanol her 1 ml TRI reagent için eklenerek RNA peleti yıkandı.
8. 7500 g'de 5 dk 4-25°C de santrifüj edildi. Alkol uzaklaştırıldı.
9. RNA pelet boyutuna göre 40-100 µl nükleazsız suda birkaç kez pipetaj yapılarak çözdürüldü.

4.2.6. DNA ve RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi

DNA ve RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop, ND1000) kullanılarak ölçüm yapıldı. 260 nm DNA ve RNA'nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorban verdiği dalga boyudur. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakıldı. 260/280

oranlarının 1.7-1.9 arasında ve A260/ A230 oranının ise 1.8-2.2 olmasına dikkat edildi. RNA örnekleri için ise A260/A280 oranlarının 1.85-2 arasında olmasına dikkat edildi.

4.2.7. DNA ve RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

5xTBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)

54 g Trisma Base (Sigma T6066)

27.5 g Borik asit (Sigma B6768)

20 ml 0.5 M EDTA (Sigma E5134) deiyonize suyla (ddH₂O) 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp Ladder Plus)

Ladder'a 166 µl 6x Loading Dye (Fermentas 0611) ve 734 µl distile su eklenerek vortekslendi.

%1'lik Agaroz Jel

Hassas terazide (Shimadzu BX320H) tartılan 1g agaroz (Sigma A 5093-500G) 1x TBE ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırında çözülmesi sağlanan jel biraz soğutulduktan sonra 5 µl Red Safe (Intron Biotechnology, RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution, katalog no: 21141) eklenerek jel tablasına döküldü ve polimerize olması için 20-30 dakika bekletildi.

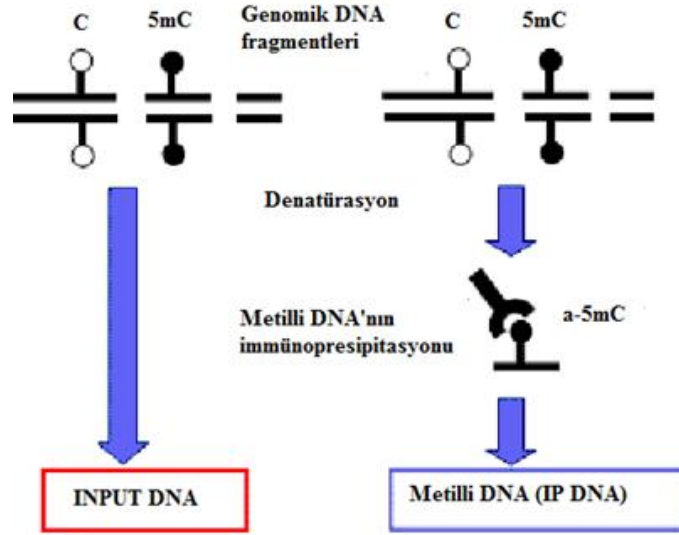
%1'lik agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. 2 µl DNA, 4 µl 6x Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 100 voltta 30 dakika yürütüldü. UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülendi ve termal yazıcı (SonyUP-D895) ile çıktı alındı.

4.2.8. Metilli DNA'nın İmmünopresipitasyonu

1. 100 ng/ μ l DNA örnek konsantrasyonuna bağlı olarak değişen hacimlerde (50-300 μ l) 1.5'luk tüpte hazırlanarak optimize edilen koşullarda 300-500 bp uzunlukta olacak şekilde parçalandı.
2. Parçalanan örnekler %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek örneklerin beklenen uzunlukta olup olmadığı kontrol edildi.
3. IP inkübasyon miksi hazırlandı.

Reaktif	Miktar
Buffer A	24 μ l
Buffer B	6 μ l
positive meDNA control	1.5 μ l
negative unDNA control	1.5 μ l
H ₂ O	45 μ l
Toplam	78 μl

4. İmmünopresipite edilecek (IP) ve kontrol (INPUT) için kullanılacak DNA örneği için iki ayrı tüp hazırlandı.
 - "IP" tüp için: 65 IP mix + 10 μ l DNA örneği konuldu.
 - "INPUT" tüp için: 13 μ l IP mix ve 2 μ l DNA konuldu. DNA elüsyonu aşamasında kullanılmak üzere input tüp 4°C'ye kaldırıldı.
5. IP örnekler 95°C'de 3 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından hemen buza alındı. 4°C kısa bir santrifüj yapıldı.
6. 0.3 μ l antibody, 0.6 μ l Buffer A, 1.1 μ l su ve 2 μ l Buffer C'den oluşan dilüe edilmiş antikor miksi hazırlandı.
7. Her bir IP tüpüne 5 μ l dilüe edilmiş antikor miksi konuldu.
8. 20 μ l meDNA-IP blocked beads eklendi.
9. Rotating wheel'de 4°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 4. 2. Metilli DNA'nın İmmünopresipitasyonu

10. IP örneklerine 450 µl Wash buffer-1 eklendi.
11. 4°C'de 5 dk rotatorda çevrildikten sonra 4°C'de 6000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
12. Süpernatant atıldı. Yıkama işlemi tekrarlandı. Wash buffer-1 ile bir kez daha yıkama yapıldı.
13. Sonra buzda bekletilen wash buffer-2 ve ardından wash buffer-3 ile yıkama yapıldı. Wash buffer-4 ile iki kez de yıkama yapıldıktan sonra wash buffer pipetle uzaklaştırıldı.
14. DNA elüsyonu ve pürifikasyonuna geçildi. Input örnekler 4°C'den alınarak santrifüj edildi ve IP örneklerle birlikte çalışıldı.
15. Hem IP örnekleri hem de input örnekler için 360 µl Buffer D, 40 µl Buffer E ve 16 µl Buffer F'den oluşan elüsyon buffer hazırlandı ve tüplere eklendi.
16. Termoshakerda 10 dk 65 °C'de 1000-1300 rpm'de inkübe edildi.
17. Oda sıcaklığına alınan örnekler aynı hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol eklendi. 13000 rpm'de 2 dk oda ısısında santrifüj edildi.
18. Üstteki sıvı faz yeni bir 1.5'luk ependorfa alındı.
19. Aynı hacimde fenol/kloroform/izoamilalkol eklendi.
20. 13000 rpm'de 2 dk oda ısısında santrifüj edildi.
21. Üstteki sıvı faz yeni bir 1.5'luk ependorfa alındı.
22. DNA co-precipitant buzda eritildi.
23. Her bir tüpe 5 µl meDNA-IP co-precipitant ve 40 µl meDNA-IP precipitant eklendi.

24. Her bir tüpe 1ml % 100 soğuk etanol eklenerek iyice karıştırıldı.
25. -20°C’de 30 dk bekletildi.
26. 25 dk 14000g’de 4°C’de santrifüj yapıldı.
27. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve pelet üzerine 500 µl %70’ lik soğuk etanol eklendi.
28. 10 dk 14000 g’de 4° C’de santrifüj yapıldı.
29. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
30. Tüpler 30 dk oda ısısında kalan etanolün uçması için bırakıldı.
31. Örnekler üzerine 50 µl TE eklendi.
32. Tüpler oda sıcaklığında shakerda 30 dk 12000 rpm’de tutularak peletin çözülmesi sağlandı.

4.2.8.1. İmmünopresipitasyon Veriminin Değerlendirilmesi

50 µl pürifiye DNA’nın (hem IP hem de input örnekler) 10 µl si yeni bir tüpe alınarak üzerine 35 µl su ilave edildi.

Reaktif	Miktar
Master mix	12.5 µl
Primer Pair	1 µl
Dilüe pürifiye DNA	5 µl
Su	6.5 µl
Toplam	25 µl

qPCR’da kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon durumları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 4. 2. qPCR’da kullanılan primer çiftleri ve beklenen amplifikasyon durumları

Primer Çifti	Input DNA örneği amplifikasyonu	Metilli DNA (IP) amplifikasyonu
Human meDNA primer çifti (AlphaX1)	+	+
Human unDNA primer çifti (GAPDH)	+	-
meDNA pozitif kontrol primer çifti 1	+	+
meDNA pozitif kontrol primer çifti 2	+	+
unDNA negatif kontrol primer çifti 1	+	-
unDNA negatif kontrol primer çifti 2	+	-

+ amplifikasyon olması beklenen, - amplifikasyon olması beklenmeyen

95°C 7 dk

95°C 15 sn

60°C 1 dk

95°C 1 dk koşullarında 40 döngü amplifikasyon yapıldı.

4.2.9. Tüm Genom Amplifikasyonu

Tüm genom amplifikasyonu için GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification kiti (WGA-2, Sigma) kullanıldı.

1. Başlangıç materyali olan 10 ng DNA üzerine 2 µl 1x Library Preparation Buffer ve 1 µl Library Stabilization Solution eklendi.
2. İyiçe vortekslendi, santrifüj edildikten sonra 95 °C'de 2 dakika termal cyclerde bekletildi.
3. Örnek hemen buza alındı ve kısa bir santrifüj yapılarak tekrar buza alındı.
4. Örnek üzerine 1 µl Library Preparation Enzyme eklenerek vortekslendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.
5. Aşağıda belirtilen koşullarda termal cyclerde inkübe edildi.
 - 16 °C 20 dakika
 - 24 °C 20 dakika
 - 37 °C 20 dakika
 - 75 °C 5 dakika
 - 4°C
6. Örnekler termal cyclerdan alınarak spin yapıldı.
7. 7.5 µl 10X Amplification Master Mix, 47.5 µl su ve 5 µl WGA DNA Polymerase reaktifleri kullanılarak master mix hazırlandı ve örneklerle eklendi. Vortekslendi, kısa bir spin yapılarak aşağıdaki termal cyclus koşullarında inkübasyona bırakıldı.

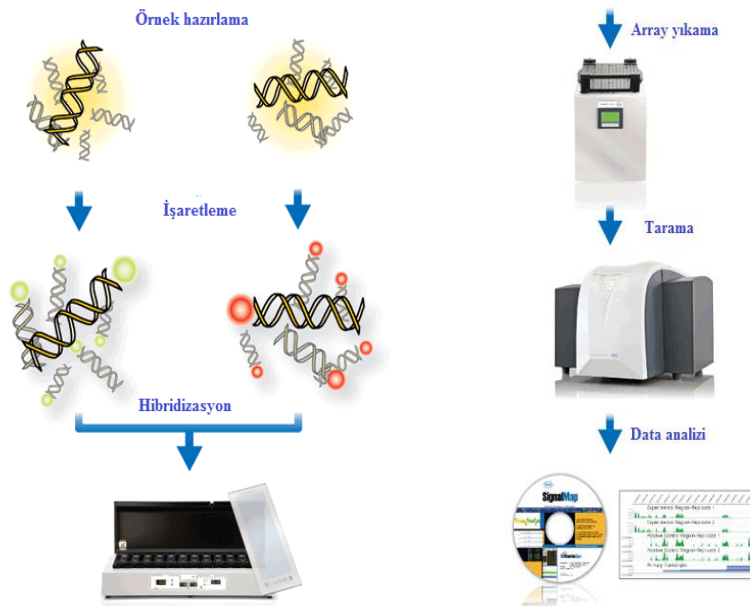
Başlangıç denatürasyonu	95°C 3 dk
Denatürasyon	94°C 15 sn
Annealing/ uzama	65°C 5 dk

4.2.10. PCR Pürifikasyonu

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Katalog no: 28106) protokolü takip edilerek örnekler pürifiye edildi.

1. Bir hacim PCR örneği üzerine 5 hacim Buffer PB konularak karıştırıldı.
2. QIAquick spin kolon 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve DNA'nın bağlanması için örnek kolona uygulandı.
3. 13000 rpm'de 30-60 sn santrifüj edildi. Tüpe geçen kısım uzaklaştırıldı.
4. Kolon tekrar aynı tüpe konuldu.
5. Yıkama için 0.75 ml Buffer PE eklenerek 13000 rpm'de 30-60 sn santrifüj edildi.
6. Dipteki kısım dökülerek QIAquick spin kolon aynı tüpe tekrar yerleştirildi.
7. 1 dk maksimum hızda santrifüj edildi. QIAquick spin kolon 1.5'luk temiz bir tüpe konuldu.
8. DNA elüsyonu için 50 µl su membran merkezine konularak 1dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.

4.2.11. Metilasyon Analizi



Şekil 4. 3. Metilasyon analizi çalışma akışı

1. Örneklerin kalite kontrolü Agilent Bioanalyzer ve RNA 6000 Nano Assay Reagent Kit (Katalog no: 5067- 1511) kullanılarak gerçekleştirildi.
2. Hem IP hem Input örnekler için 3.5 µg DNA ile başlandı.
3. NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit (Katalog no: 06 370 250 001) protokolü takip edilerek örnekler işaretlendi.
4. Cy3-Random ve Cy5-random nonamerler kullanılarak IP örnek Cy-5 ile ve Input örnek Cy-3 ile boyandı.
5. 15 ml'lik tüpte 2200 µl random primer buffer, 4 µl β-Merkaptoetanolden oluşan solüsyon hazırlandı.
6. Cy-3 Random ve Cy-5 Random nonamerler kısaca santrifüj edildi ve 1050 µl hazırlanan solüsyon ile dilüe edildi.
7. IP ve input örnekler 1 µg olacak şekilde PCR tüplerine alındı.
8. Dilüe edilen 40 µl Cy3 random nonamerler ve 40 µl dilüe Cy5 random nonamerler kullanılarak son hacim 80 µl'ye PCR grade su ile tamamlandı.
9. Örnekler 98 °C'de 10 dakika denatüre edildi ve 2 dk buzlu suda bekletildi.
10. 10 µl dNTP mix (10 mM), 8 µl PCR grade su ve 2 µl Klenow Fragment (3'-5' exo) den oluşan dNTP/Klenow master miksi hazırlandı ve denatüre edilen örnekler üzerine eklendi.
11. 10 kez pipetaj ve ardından ve kısa bir spin yapıldı.
12. 37 °C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı.
13. 21.5 µl Stop solüsyonunun eklenmesiyle reaksiyon sonlandırıldı.
14. Örnekler kısaca vortekslendi, spin yapıldı ve 110 µl izopropanol içeren tüplere konuldu.
15. İyice vortekslendi ve +15 - 25°C'de 10 dakika ışıktan korunarak inkübe edildi.
16. 12000 g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant pipetle uzaklaştırıldı.
17. 500 µl %80'lik soğuk etanol ile yıkanan pelet birkaç kez pipetaj yapılarak yerinden oynatıldı.
18. 12000 g'de 2 dk santrifüj edildi süpernatant pipetle uzaklaştırıldı.
19. Bileşenler kuruyana kadar (yaklaşık 5 dk) Speed vac'da düşük sıcaklıkta kurutuldu ve bu süreçte ışıktan korundu.
20. Tüpler kısaca santrifüj edildi ve her bir peleti çözdürmek için 25 µl PCR grade su eklendi.
21. 30 sn vortekslendi ve kısa bir spin yapıldı.

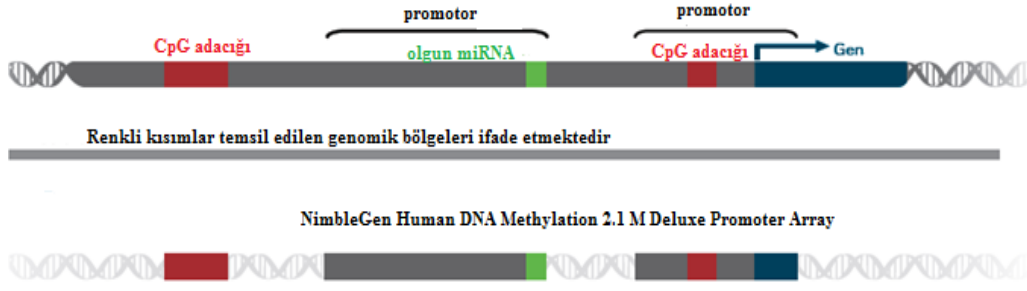
22. Pelet tamamen çözülene kadar vortekslemeye devam edildi. Tekrar kısa bir spin yapıldı.
23. Örneklerin konsantrasyonunu belirlemek için nanodropta spektrofotometrik ölçüm yapıldı.
24. Hem IP hem de Input örnek için 34 µg DNA miktarına ulaşılan örneklerle hibridizasyona devam edildi.
25. Hibridizasyon sistemi 42°C'ye ayarlandı. En az 3 saat beklenerek sıcaklığın stabilize olması sağlandı.
26. Kurutulmuş pelet üzerine 12.3 VWR su eklenerek pelet yerinden kaldırıldı.
27. Tüpler vortekslendi ve bileşenlerin tüpün dibinde toplanması sağlandı.
28. NimbleGen Hybridization Kit kullanılarak Hybridization solution master mix hazırlandı.

Reaktif	Miktar
2x Hybridization Buffer	29.5 µl
Hybridization Component A	11.8 µl
Alignment Oligo	1.2 µl
Toplam	42.5 µl

29. Her bir örneğe uygun miktarda hibridizasyon solusyonu eklendi.

	Miktar
Örnek	12.3 µl
Hybridization solution	31.7 µl
Toplam	44 µl

30. 15 saniye vortekslendi, spin yapıldı. 95°C'de 5 dk inkübe edildi.
31. Tüpler 42°C'de yükleme yapılıncaya kadar bekletildi. Yüklemeden önce vortekslendi ve spin yapıldı.
32. Mixerler hazırlandı.
33. Hazırlanan örnek Nimblegen Human DNA Methylation 2.1 Deluxe Promoter Arrayle hibridize edildikten sonra yıkama ve tarama işlemleri gerçekleştirildi.



Şekil 4. 4. DNA metilasyon array yapısı (244)

Metilasyon analizinde kullanılan promotor arraylerde gen ve mikroRNA promotorlarını, CpG adacıklarını temsil eden problemler yanında deneysel performansın değerlendirilmesi için değişik pozitif, negatif ve non-CpG kontrol bölgeleri de bulunmaktadır.

Nimblegen Human DNA Methylation 2.1 M Deluxe Promoter Array özellikleri

- HG19 (sekans kaynağı: USCS Genome Browser, NCBI)
- Prob sayısı: 2.1 milyon
- Prob uzunluđu: 50-75 mer
- Problemler arası boşluk: 100 baz
- CpG adacığı sayısı: 27.891
- miRNA promotor sayısı: 474 (olgun miRNA sekansının 15 kb yukarı bölgesinden başlayacak şekilde)
- Transkripsiyon başlama bölgesinden 7250 baz yukarı bölge ve 3250 baz aşığı bölgeyi kapsamaktadır.

4.2.12. Metilasyon Analizinden Elde Edilen Verinin Biyoinformatik Analizi

4.2.12.1. Nimblescan

Nimblescan, metilasyon datasının analizinde kullanılmak üzere üretici firma tarafından geliştirilen bir analiz programıdır. Görüntü dosyasının işlenmesinin ardından CHARM algoritmasında kullanılacak olan xys dosyası oluşturulmaktadır.

4.2.12.2. Charm Algoritması ile Farklı Metilasyon Gösteren Bölgelerin Belirlenmesi

Tedavi öncesi ve sonrası array çalışması yapılan örneklerin analizi R Bioconductor platformunda CHARM algoritması kullanılarak yapılmıştır. CHARM, Nimblegen mikrodizinlerinden elde edilen metilasyon verisinden metilasyon seviyelerini tahmin etmek ve elde edilen değerlerin deney tasarımı doğrultusunda uygun şekilde karşılaştırılmasını sağlamak üzere özel geliştirilmiş bir analiz paketidir. İki aşamadan oluşan analizde önce metilasyon seviyelerinin tahmini ve ardından bu bölgelerin deney grupları arasında karşılaştırılması yapılmaktadır.

Bu algoritma ile; kalite kontrol, normalizasyon, yüzde metilasyon belirlenmesi, farklı metilasyon gösteren bölgelerin belirlenmesi ve bunların grafiksel gösterimi gerçekleştirilmektedir. CHARM algoritması ile yapılan analizlerle, farklı metilasyon gösteren bölgeler (DMR-Differentially Methylated Regions) belirlenirken eşli (pairwise) karşılaştırma yapılmıştır.

Metilasyon analizlerinin ana zorluklarından biri, arrayden alınan sinyallerin metilasyon değerlerine dönüştürülmesidir. CHARM metilasyon seviyelerini iki bileşenli bir strateji kullanarak tahmin etmektedir. Öncelikle sistematik yanın giderilmesi için (systematic bias) metilasyon log-oranları normalize edilmektedir. Tüm normalizasyon teknikleri mikrodizin verisi kullanılarak tahmin edilecek yüzde metilasyon değerlerinin sabit varsayılacağı bileşen ya da genel mikrodizin karakteristiklerinin tanımlanmasına dayanmaktadır. Bu tespitin ardından normalizasyonla bu değerlerin örnekler arasında eşitlenmesi sağlanmaktadır. Ardından normalize edilmiş log-oranları metilasyon yüzdesi tahminlerine dönüştürülmektedir. İkinci aşamada gruplar arasında metilasyonu anlamlı düzeyde farklılık gösteren bölgelerin tespiti gerçekleştirilmektedir. Burada bir önceki aşamada elde edilen metilasyon yüzde tahminlerinin karşılaştırılması yapılmaktadır. Çalışmada, deney tasarımının gereği doğrultusunda, grupların eşli örneklerden oluştuğu göz önünde bulundurularak öncelikle metilasyon değerleri özel bir t-istatistiği ile değerlendirilmiştir. İstatistiğin anlamlılık kesme noktası olarak 0.995 seçildikten sonra farklı metilasyon gösteren kromozom bölgeleri belirlenmiştir.

Charm algoritması kullanılarak elde edilen listelerdeki önemli parametreler

p1: DMR olarak tanımlanan kromozom bölgesinin başlangıç ve bitiş noktaları arasında bulunan tüm problemlerin ortalama metilasyon yüzdesi (1. grup için)

p2: DMR olarak tanımlanan kromozom bölgesinin başlangıç ve bitiş noktaları arasında bulunan tüm problemlerin ortalama metilasyon yüzdesi (2. grup için)

nprobes: DMR olarak tanımlanan kromozom bölgesinde bulunan toplam prob sayısı

diff: DMRler arasındaki ortalama yüzde metilasyon farkı

area: nprobes x average difference

“area” değeri DMR’deki toplam prob sayısının ortalama farkla çarpımından elde edilmektedir.

ttarea: nprobes x (average probe level t-statistic for between group difference)

“ttarea” değeri ise DMR’deki toplam prob sayısının gruplar arasındaki fark için t istatistiği ortalaması ile çarpımıyla elde edilmektedir.

4.2.12.3. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerindeki Genlerin Belirlenmesi

Karşılaştırmalarda farklı metilasyon gösteren kromozom bölgelerinde bulunan genler anote edildi.

4.2.12.4. Gen Ontoloji, Zenginleşme ve Yolak Analizleri

Yüksek işlem hacimli genomik, proteomik ve biyoinformatik tarama yaklaşımları değişik biyolojik mekanizmaları çalışmayı mümkün kılmaktadır. Bu teknolojilerin kullanımı neticesinde genellikle çok sayıda genin bulunduğu bir gen listesi elde edilmektedir. Büyük çaptaki gen listesinin analiz edilmesiyle veri setindeki biyolojik anlamın ortaya çıkarılması önemlidir. Bu analizlerin gerçekleştirilebilmesi için GoMiner, GOstat, Onto-express,

GoToolBox, FatiGO, GFINDER, GOBar, GSEA ve DAVID gibi özel biyoinformatik yazılım paketleri geliştirilmiştir.

DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), biyolojik bilgi veritabanı ve analitik araçların bulunduğu, büyük gen ve protein listelerindeki biyolojik bilginin sistematik olarak çıkarılmasını sağlayan biyoinformatik kaynaklar bütünüdür (245). Verilen gen listesi üzerinden genlerin fonksiyonel sınıflandırılması, fonksiyonel anotasyon kümelenmesi ve yolak analizleri gerçekleştirilmektedir.

Farklı özellikleri ve güçlü yönleri bulunan biyoinformatik araçlar, verilen gen listesi içinde biyolojik anotasyon ilişkisi (gen ontoloji terimi gibi) bulunan genleri sistematik bir harita üzerine oturtmak için değişik stratejiler kullanmaktadır. DAVID’de kullanılan önemli parametrelerden biri de zenginleşme skorudur (enrichment score). Zenginleşme skorunun derecesini belirlenmek için belirli bir arka plan kullanılarak karşılaştırma yapılmaktadır. Arka plan, insan genomuyla ilgili bir çalışma yapılıyorsa insan genomunda ilgilenilen genin oranını ifade etmektedir. Örneğin insan genomunda genlerin %1’i kinazlar iken analiz yapılmak üzere verilen gen listesinde kinazların oranının %10 çıkması bu gen grubunda zenginleşme (yoğunluk) olduğunu göstermektedir. Bu zenginleşme (enrichment), χ^2 , Fisher’s exact test, binom olasılığı ve hipergeometrik dağılım gibi istatistiksel yöntemlerle kantifiye edilmektedir. Çalışmamızda enrichment değeri (enrichment score) 1.3 ve üzeri olan gen grupları ve skoru 1.3’ ten küçük olan ancak konuyla ilgili önemli olabilecek gen grupları üzerinden ileri araştırmalar yapılmıştır.

4.2.13. RNA Örneklerinin Bütünlük ve Kalite Analizi

İzole edilen RNAların kalite ve bütünlük Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit kullanılarak Agilent 2100 Biyoanalizörü’nde gerçekleştirildi.

Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit Protokolü

Jel hazırlanması


1. Tüm reaktifler kullanımdan 30 dakika önce oda sıcaklığına çıkarılarak bekletildi.
2. 550 μ l Agilent RNA 6000 Nano gel matrix (kırmızı) filtreye yüklendi.
3. 1500 g’de 10 dk santrifüj edildi.

4. Filtreden geçirilen jel 65 µl'lik alikatlarda halinde 4°C'de saklandı.

Jel-Boya Karışımının Hazırlanması

1. Tüm reaktifler kullanımdan 30 dk önce oda sıcaklığında bekletildi. Boya ışıktan korundu.
2. RNA 6000 Nano boya (mavi) 10 saniye vortekslendi ve kısa spin yapıldı.
3. 1 µl RNA 6000 Nano boya daha önce hazırlanan ve filtreden geçirilmiş olan 65 µl jelin üzerine konuldu ve vortekslendi. Boya tekrar 4°C'de karanlıkta saklandı.
4. 10 dk oda sıcaklığında 13000g'de santrifüj edildi.

Jel Boya Karışımının Yüklenmesi

1. RNA nano çip, çip priming istasyonuna yerleştirildi. 9 µl jel-boya karışımı  işaretli kuyucuğa yüklendi.
2. Pistonun 1 ml çizgisinde olmasına dikkat edilerek istasyon kapatıldı.
3. Piston klipsin tutacağı yere kadar indirildi, yaklaşık 30 saniye bekledi ve klips serbest bırakıldı. Pistonun 0.3 ml'e kadar geldiği gözlemlendikten sonra 5 saniye beklenir ve piston 1 ml pozisyonuna getirildi. Çip priming istasyonu açıldı.
4. 9 µl jel-boya karışımı diğer işaretli iki kuyuya da eklendi.

RNA 6000 Nano Marker Yüklenmesi

5 µl RNA 6000 Nano marker ladder işaretli kuyuya ve diğer 12 örnek kuyusuna konuldu. Örnek yüklenmeyen kuyulara 1 µl su eklendi.

Ladder ve Örneklerin Yüklenmesi

1. Kullanmadan önce ladder çözündürüldü ve buzda bekletildi.
2. Sekonder yapıları azaltmak için örnekler çipe yüklenmeden önce 70 °C'de 2 dakika denatüre edildi.
3. 1 µl RNA ladder işaretli yere yüklendi. Her bir örnekten 1 µl kuyulara yüklendi.
4. Çip IKA vortekste 2400 rpm'de 1 dakika vortekslendi, hava kabarcığı olmamasına dikkat edilerek cihaza yüklendi.

4.2.14. cDNA sentezi

500 ng RNA ile başlanarak Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Katalog no: 04 897 030 001) protokolüne göre 100 µl son hacimde cDNA sentezi yapıldı.

	Miktar
RNA	500 ng
Su	Değişken
Random hexamer primer	10 µl
Toplam	65 µl

Hazırlanan örnekler 65°C'de 10 dakika termal cyclerda inkübasyona bırakıldı. Ardından hemen buza alındı. Üzerine aşağıda belirtilen reaktifler eklendi.

Reaktif	Miktar
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc	20 µl
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ µl	2.5 µl
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	10 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase, 20 U/ µl	2.5 µl

Kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra tüpler

25°C 10 dakika

50°C 60 dakika

85°C 5 dakika termal cyclerda bekletildi.

4.2.15. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

Real Time ready catalog assays protokolü uyarınca (Katalog no: 05 532 957 001, Roche) reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Reaktif	Miktar
Su (PCR grade)	5 µl
LightCycler 480 Probes Master	2 µl
RealTime ready assay	0.5 µl
cDNA	2.5 µl
Toplam	10 µl

qRT-PCR Programı	
Pre-inkübasyon	95°C 10 dk
Amplifikasyon	95°C 10 sn 62°C 30 sn 72°C 1 sn } 45 döngü
Cooling	40°C 30 sn

Metilasyon analizi sonucunda belirlenen metilasyon değişiminin gen ekspresyonuna olan etkisini değerlendirmek üzere, gerçekleştirilen gen ontoloji ve yolak analizleri neticesinde elde edilen listelerden seçilen **CASP4, CFL1, MAP3K5, ID2, ELK1, DNMT3A, RUNX1, HSPD1, SLC11A1, CHD8, ZAP70, DOCK2, CRKL, PRKCD, SIVA1, CDC42, PAK2** ve housekeeping olarak çalışılması uygun görülen **ABL, PPIB** ve **B2M** genlerine ait primer-problar kullanıldı. Metilasyon değişimi fazla olan genlerde bu durumun ekspresyon üzerine etkisinin görülme ihtimali daha yüksek olabileceği göz önünde bulundurularak metilasyon değişimi en fazla olan genler arasından seçim yapılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DNA ve RNA Örneklerinin Spektrofotometrik Analizi

İzole edilen DNA ve RNA örneklerinin nanodrop ölçümü sonucunda elde edilen konsantrasyonları Çizelge 5.1 ve 5.3'te görülmektedir.

Çizelge 5. 1. DNA örneklerinin spektrofotometrik analiz sonuçları

Örnek numarası	ng/µl	260/280
11/04	343.31	1.96
11/13	2413.77	1.78
11/14	698.17	1.58
11/15	1093.65	1.71
11/17	119.49	1.9
11/22	855.76	1.94
11/23	1396.28	1.97
11/24	182.79	1.86
12/20	370.61	1.97
12/21	1639.32	1.89
12/22	275.16	1.89
12/24	866.22	1.8
12/35	424.75	2.14
12/36	442.1	1.93
12/70	711.49	1.84
12/71	135.95	1.71
12/72	832.75	1.97
12/73	160.73	1.81
12/74	634.97	1.94
12/75	643.65	1.92
12/76	3322.9	1.89
12/78	207.45	1.94
12/81	102.16	1.91
12/82	10.28	1.52
12/83	3882.23	1.88
12/84	3265.13	1.30
13/01	446.16	1.92
13/02	92.98	1.86
13/25	538.58	1.95
13/26	560.77	1.92
13/27	1140.34	2.04
13/29	546.16	2.09
13/53	600.67	1.96
13/54	3046.46	1.95
13/75	1392.3	1.99
13/76	174.49	1.85
13/85	1066.65	1.78
13/271	851.58	1.89

11/13A	2874.52	1.91
11/14A	528.5	1.53
11/15A	204.16	1.95
11/23A	35.12	1.89
11/24A	297.75	1.91
12/20A	64.19	1.72
12/22A	463.91	1.85
12/36A	154.58	1.9
12/70A	57.8	1.59
12/71A	29.25	1.7
12/73A	94.71	1.77
12/74A	40.61	2.05
12/82A	142.88	1.91
12/84A	2874.68	1.94
13/25A	24.82	1.64
13/26A	1217.56	2
13/27A	38.09	1.85
13/76A	34.75	1.79

Çizelge 5. 2. DNA örneklerine ait konsantrasyon sonuçları

	Konsantrasyon (ng/µl) min-max	260/280 max-min	Konsantrasyon (ng/µl) ort	260/280 ort
DNA Örnekleri (n=56)	10.28 - 3882.23	1.3 - 2.14	797.6	1.85

Çizelge 5.1’de görüldüğü gibi hasta ve sağlıklı kontrollere ait kemik iliği örneklerinden hücre ayrıştırması yapıldıktan sonra fenol-kloroform yöntemiyle gerçekleştirilen izolasyon sonucu elde edilen DNA konsantrasyonları immünopresipitasyon aşaması ve devamında yapılan metilasyon analizleri için yeterlidir. DNA örnekleri için 260/280 oranının 1.8-2 olması saf bir DNA varlığını göstermektedir. Bu bilgi ışığında DNA’ların saflık dereceleri iyi görünmektedir.

Çizelge 5. 3. RNA örneklerinin spektrofotometrik analiz sonuçları

Örnek numarası	ng/µl	260/280
11/04	688.78	1.93
11/13	1281.18	1.85
11/14	422.04	2.08
11/15	325.83	1.86
11/17	410.49	2.06
11/22	850.78	1.79
11/23	1159.77	1.8
11/24	177.25	1.87
12/20	131.98	1.83

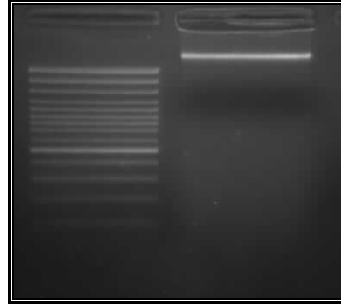
12/21	354.82	1.92
12/22	109.45	1.81
12/24	70.1	1.79
12/35	1163.07	2.04
12/36	301.42	1.84
12/70	216.25	1.82
12/71	54.5	1.77
12/72	361.75	1.88
12/73	195.29	1.9
12/74	452.78	1.91
12/75	754.18	1.97
12/76	1616.83	1.95
12/78	79.82	1.84
12/81	35.54	1.74
12/82	38.75	1.76
12/83	752.77	2
12/84	1039.23	2
13/01	272.04	1.9
13/02	87.58	1.84
13/25	201.07	1.88
13/26	1339.79	2.06
13/27	308.77	1.94
13/29	256.15	1.95
13/53	204.15	1.91
13/54	585.5	1.97
13/75	838.33	1.85
13/76	526.73	1.82
13/85	-	-
13/271	207.2	1.91
11/13A	2178.27	2.05
11/14A	182.54	1.87
11/15A	82.57	1.78
11/23A	1365.89	2.05
11/24A	241.16	1.87
12/20A	56.49	1.85
12/22A	54.77	1.78
12/36A	66.64	1.79
12/70A	45.76	1.85
12/71A	656.75	1.79
12/73A	83.01	1.83
12/74A	14.99	1.97
12/82A	446.66	2.17
12/84A	1937.78	1.97
13/25A	24.82	1.64
13/26A	1217.56	2
13/27A	38.09	1.85
13/76A	34.75	1.79

Çizelge 5. 4. RNA örneklerine ait konsantrasyon sonuçları

	Konsantrasyon (ng/µl) min-max	260/280 max-min	Konsantrasyon (ng/µl) ort	260/280 ort
RNA Örnekleri (n=55)	14.99 – 2178.27	1.64 - 2.17	483.64	1.89

5.2. DNA ve RNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi

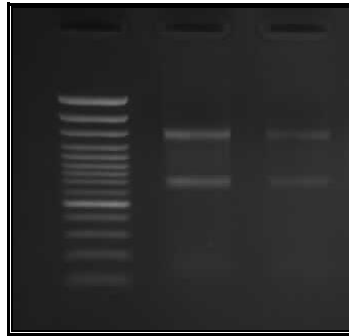
Fenol- kloroform yöntemiyle izole edilen DNA örneklerine ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5. 1. DNA örneklerine ait temsili %1’lik agaroz jel görüntüsü

Agaroz jelde yürütülen DNA örneklerinin tek bant şeklinde olması DNA’ların intakt olduğunu, örneklerde degradasyon bulunmadığını göstermektedir.

İzole edilen RNA örneklerine ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5. 2. RNA örneklerine ait temsili %1’lik agaroz jel görüntüsü

Agaroz jelde yürütülen RNA örneklerinin beklenildiği gibi iki bant şeklinde olması örneklerin degrade olmadığını, bu da real-time çalışmasında kullanılacak kalitede RNA elde edildiğini göstermektedir.

5.3. Metilli DNA'nın İmmünopresipitasyonu

İmmünopresipitasyonun ilk aşaması olan fragmentasyonda örnekler 300-500 bp aralığında olacak şekilde sonikasyonla parçalandıktan sonra boyutların istenilen uzunlukta olup olmadığının belirlenmesi amacıyla örnekler %1.5'lük agaroz jele yüklendi.

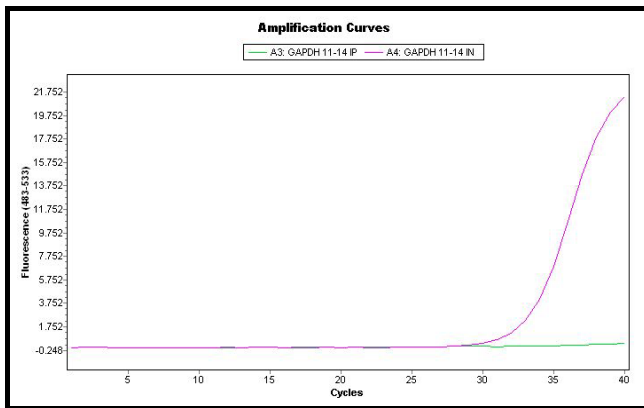


Şekil 5. 3. Fragmente edilen DNA örneklerine ait temsili %1.5' luk agaroz jel görüntüsü

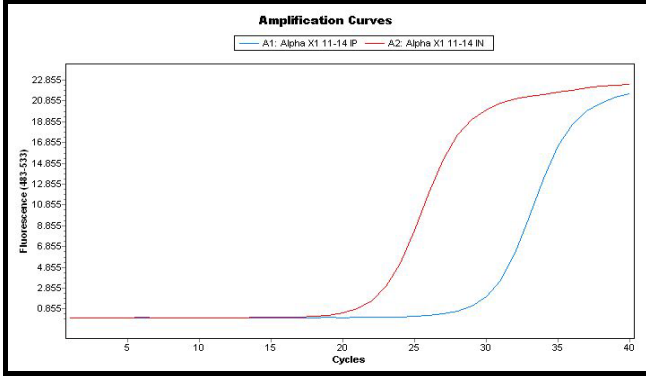
Fragmentasyon aşamasından sonra elde edilen uygun uzunluktaki örneklerle immünopresipitasyona devam edildi.

5.4. İmmünopresipitasyon Veriminin QPCR ile Değerlendirilmesi

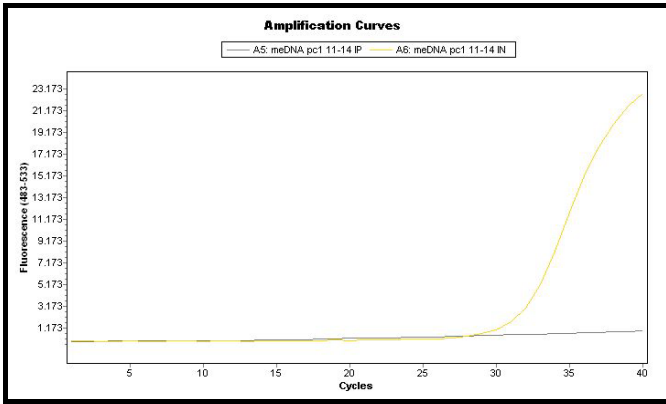
İmmünopresipitasyon veriminin değerlendirilmesi için yapılan qpcr sonucu elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait temsili sonuçlar her bir primer için aşağıda verilmiştir.



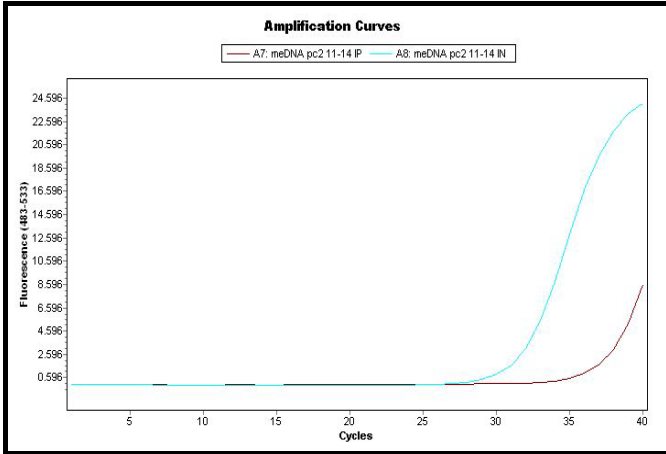
Şekil 5. 4. GAPDH primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi



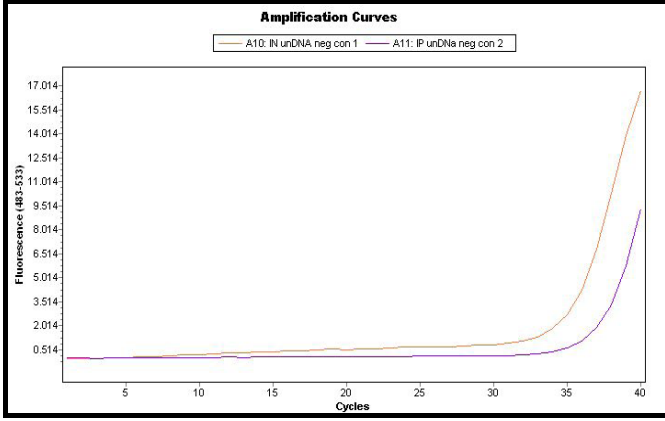
Şekil 5. 5. AlphaX1 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi



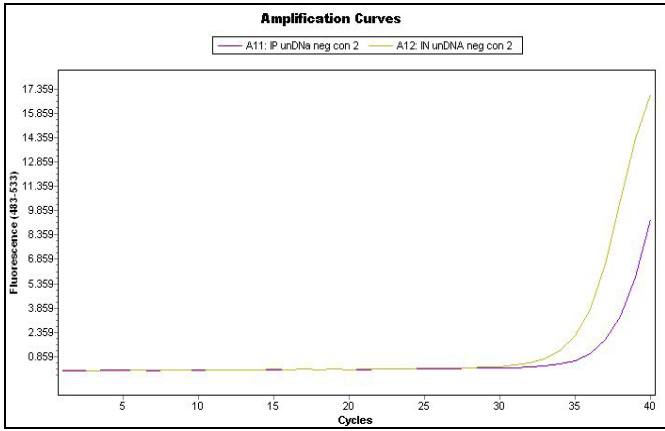
Şekil 5. 6. meDNA pozitif kontrol 1 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi



Şekil 5. 7. meDNA pozitif kontrol 2 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi



Şekil 5. 8. unDNA negatif kontrol 1 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi



Şekil 5. 9. unDNA negatif kontrol 2 primerine ait temsili amplifikasyon eğrisi

Çizelge 5. 5. QPCR' da elde edilen temsili Cp değerlerine ait sonuçlar

Primer	Ip Cp	Beklenen amplifikasyon	Input Cp	Beklenen amplifikasyon
AlphaX1	20.32	+	19.70	+
GAPDH	-	-	30.62	+
meDNA pozitif kontrol 1	29.78	+	30.63	+
meDNA pozitif kontrol 2	30.02	+	30.32	+
unDNA negatif kontrol 1	-	-	32.41	+
unDNA negatif kontrol 2	-	-	32.40	+

Cp değeri : Örneğin amplifiye olmaya başladığı döngüyü ifade etmektedir.

Ip: İmmünopresipite edilen örnek (sadece metilli DNA bölgeleri bulunmaktadır)

Input: Aynı örneğin immünopresipite edilmeyen kontrolü (hem metilli hem metilli olmayan DNA bölgeleri bulunmaktadır)

- AlphaX1 geni **metilli** gen bölgesini temsil etmektedir. Cp değerlerine bakıldığında, hem IP hem de Input örneklerin beklenildiği gibi bu primer ile amplifiye olduğu görülmektedir.
- GAPDH geni ise **metilli olmayan** gen bölgesini temsil etmektedir. İlgili gene ait primerlerle yapılan QPCR’da IP örneklerin amplifiye olmaması, Input örneklerin ise amplifiye olması beklenmektedir. Elde edilen sonuçlar metilli gen bölgelerinin verimli şekilde çöktürüldüğünü göstermektedir.
- meDNA pozitif ve unDNA negatif kontrol primerleri ise kitteki internal kontrollerdir.

Beklenen amplifikasyon durumlarının da özetlendiği Çizelge 5.5’te örneklere ait sonuçlar immünopresipitasyonun başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

5.5. İmmünopresipitasyon Sonucunda Elde Edilen DNA’nın Miktar Tayini Sonuçları

Çizelge 5. 6. İmmünopresipitasyondan elde edilen Ip ve Input örneklere ait temsili spektrofotometrik analiz sonuçları

Örnek	ng/ul	260/280
11-14 IP	160.5	1.77
11-14 INPUT	257	1.92
11-15 IP	26.85	1.7
11-15 INPUT	49.69	1.74
11-15 A IP	180.37	1.81
11-15 A INPUT	123.16	1.72
11-23 IP	14.18	1.66
11-23 INPUT	43.15	1.67
11-23 A IP	16.28	1.44
11-23 A INPUT	77.62	1.69
11-24 IP	47.64	1.75
11-24 INPUT	161.42	1.78
11-24 A IP	5.13	1.39
11-24 A INPUT	20.8	1.59

Array aşamasında kullanılmak üzere 1 µg DNA’ya (hem Ip hem Input için) ihtiyaç duyulmaktadır. Nanodrop sonuçlarına bakıldığında bazı örneklerde yeterli miktara ulaşamadığı görülmektedir. Bu nedenle sonuçları değerlendirme aşamasında sıkıntı teşkil etmemesi açısından tüm örneklerin genom boyu amplifikasyonu yapılmıştır.

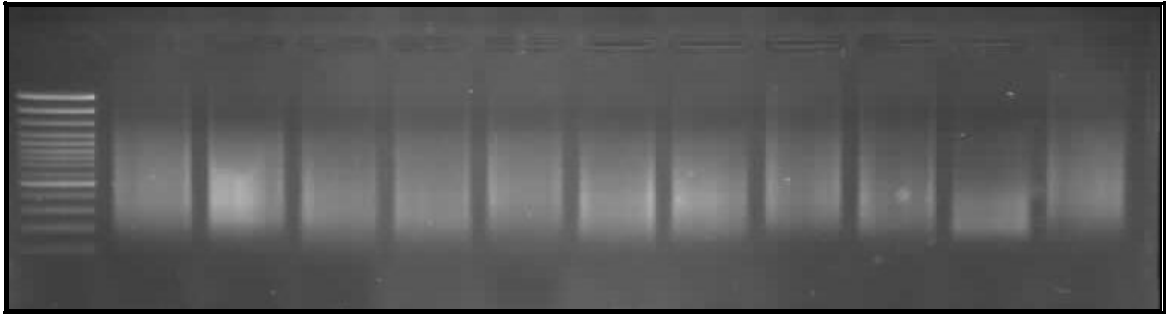
5.6. Tüm Genom Amplifikasyonu ve PCR Pürifikasyonu Sonuçları

Amplifiye edildikten sonra QIAquick PCR Purification Kit kullanılarak pürifiye edilen örnekler nanodropta ölçüldü ve ardından %1.5' luk agaroz jelde yürütüldü.

Çizelge 5. 7. Tüm genom amplifikasyonu sonrası pürifiye edilen Ip ve Input örneklere ait temsili spektrofotometrik analiz sonuçları

Örnek	ng/ μ l	260/280
11-14 IP WGA	69.39	2
11-14 INPUT WGA	124.15	1.98
11-15 IP WGA	47.81	1.84
11-15 INPUT WGA	140.25	1.94
11-15 A IP WGA	82.49	1.97
11-15 A INPUT WGA	56.28	1.78
11-23 IP WGA	126.27	1.95
11-23 INPUT WGA	44.41	1.82
11-23 A IP WGA	45.82	1.83
11-23 A INPUT WGA	39.71	1.87
11-24 IP WGA	145.28	1.97
11-24 INPUT WGA	127.37	1.94
11-24 A IP WGA	188.08	1.93
11-24 A INPUT WGA	148.86	1.93

Tüm örnekler için metilasyon analizi aşamasında gerekli olan 1 μ g DNA miktarına ulaşılmıştır.

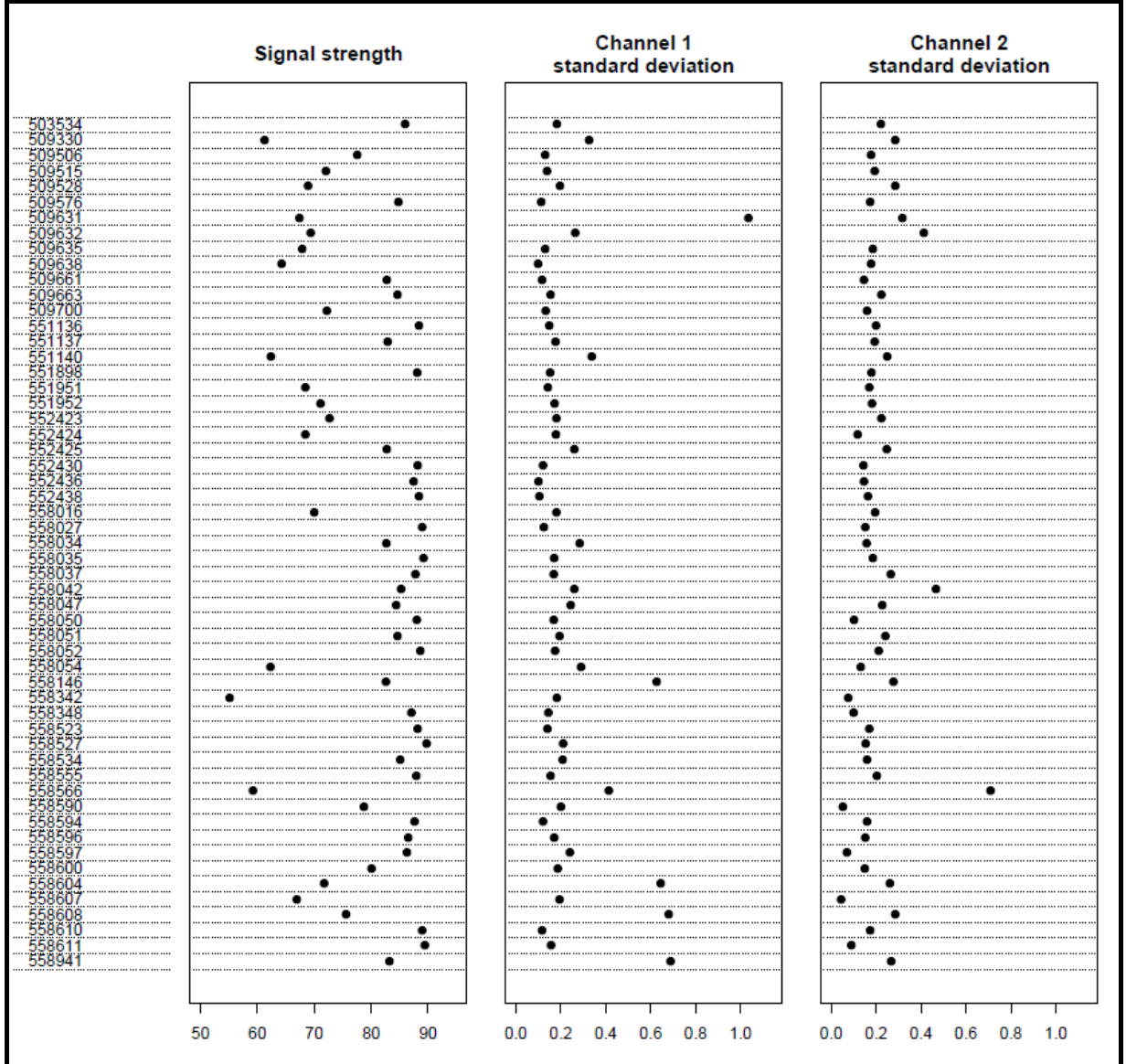


Şekil 5. 10. Tüm genom amplifikasyonu yapılan ve pürifiye edilen örneklere ait temsili %1.5' luk agaroz jel görüntüsü

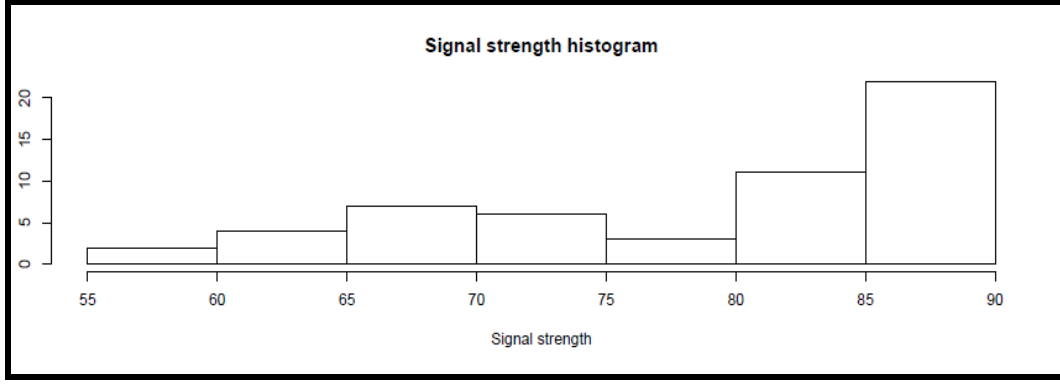
5.7. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

5.7.1. Kalite Kontrol Sonuçları

Tüm arraylere ait kalite kontrol sonuçları Şekil 5.11’de görülmektedir.

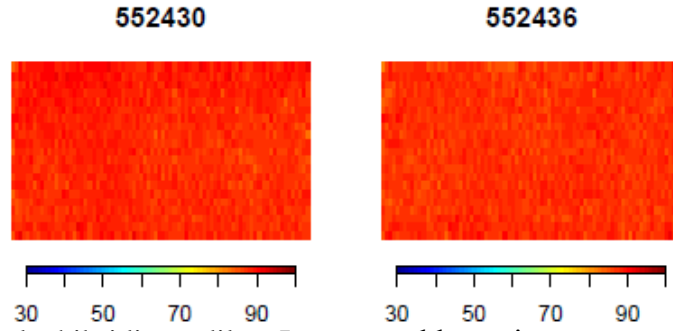


Şekil 5. 11. Arraylerden alınan sinyal gücü ve standart sapmalara ilişkin grafik

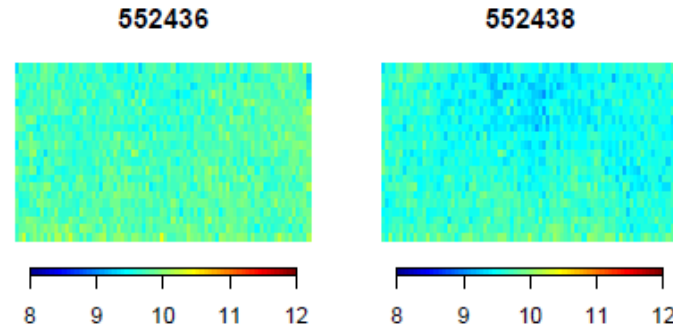


Şekil 5. 12. Arraylerden alınan sinyal gücü histogramı

Arraylerin çoğundan 80-90 aralığında sinyal alındığı görülmektedir. Bu sonuçlar arraylerin hibridizasyon, yıkama ve boyama aşamalarının başarılı şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.



Şekil 5. 13. Arrayle hibridize edilen Input örneklere ait ışıma veren problemlerin temsili gösterimi



Şekil 5. 14. Arrayle hibridize edilen immünopresipite (IP) örneklere ait ışıma veren problemlerin temsili gösterimi

Arraylerden alınan sinyal sıklıkları, 532 ve 635 olmak üzere iki kanaldan elde edilen değerlerin standart sapmalarıyla birlikte Ip ve Input örneklere ait problemlerden alınan ışımalar göz önünde bulundurularak sonuçlarda kirlilik yaratacağı düşünülen örnekler

analizden çıkarılmıştır. Analizden çıkarılan örneklere ilişkin bilgiler Çizelge 5.8’de görülmektedir. Kalite kontrol aşamasını geçen örneklerle analize devam edilmiştir.

Çizelge 5. 8. Kalite kontrol sonuçlarına göre analizden çıkarılan örneklere ait bilgiler

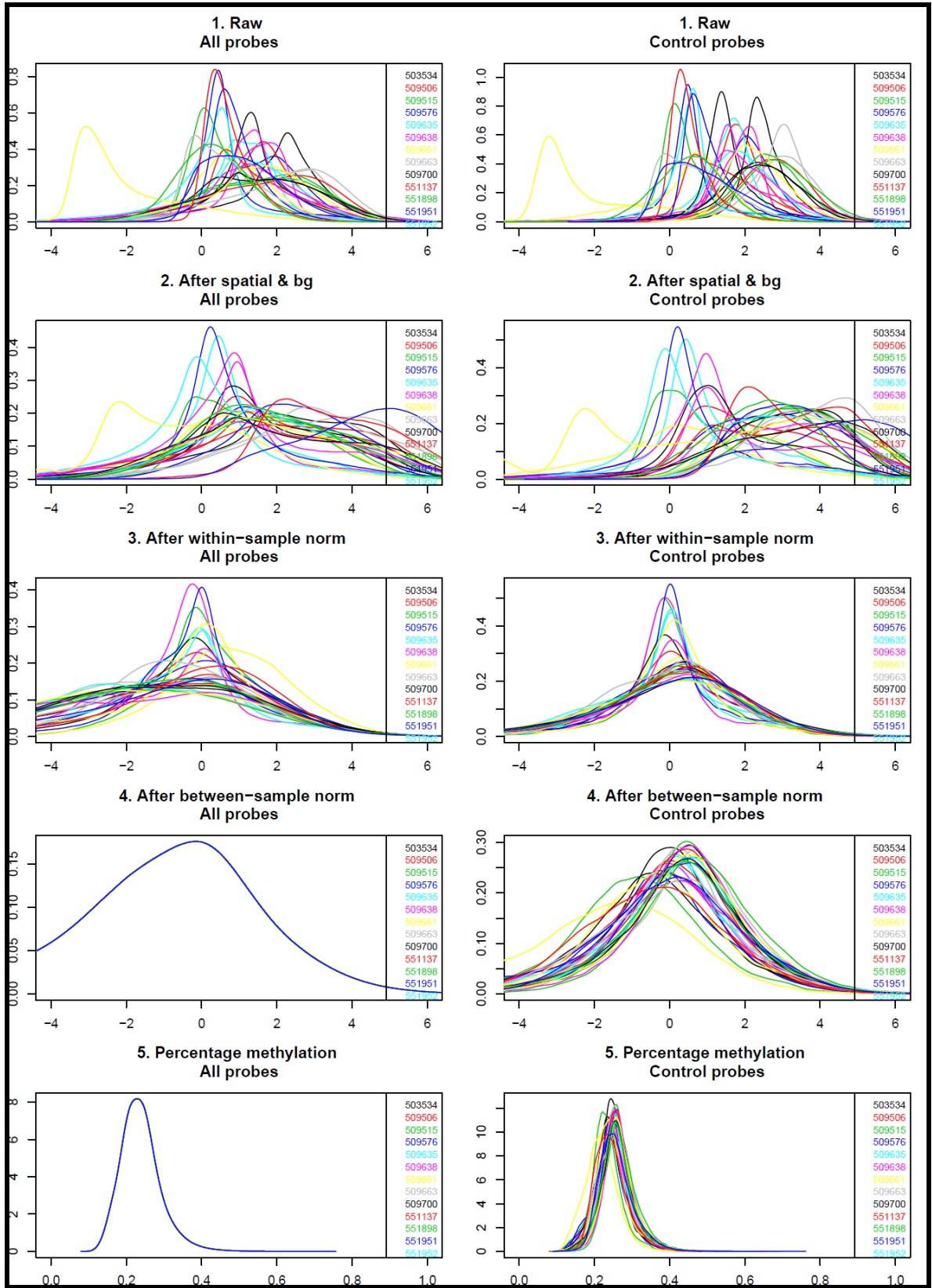
Dosya adı	Örnek	Açıklama	PM sinyal sıklığı
509330	11-14A	Uzamsal hibridizasyon sorunu, düşük sinyal	61.28
509631	11-15		67.38
509632	11-15A		69.35
551140	12-35		62.34
558054	12-24		62.28
558342	12-82		55.11
558566	11-17		59.25
558604	12-72		71.72
558608	12-83		75.59
558941	12-21		83.24
552437	12-36A	xys dosyasında problem var	
552425	12-36	552437 eşi analizden çıkarıldı	82.74
509528	11-14	509330 eşi analizden çıkarıldı	68.90
558534	12-82A	558342 eşi analizden çıkarıldı	85.08

Kalite kontrol sonrası analize devam edilen örnek sayısı Çizelge 5.9’da görülmektedir.

Çizelge 5. 9. Kalite kontrol sonrası analize devam edilen örnek sayısı

Örnek	Örnek Sayısı	Kalite kontrol sonrası
Tedavi öncesi ve sonrası	18	14
Sadece tedavi öncesi	15	6
Sağlıklı kontrol	5	5

5.7.2. Normalizasyon Sonuçları



Şekil 5. 15. Normalizasyon öncesi ve sonrasında bütün problemlerin ve kontrol problemlerinin yoğunluk grafikleri

5.7.3. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerine İlişkin Sonuçlar

Çizelge 5. 10. Karşılaştırmalardan elde edilen farklı metilasyon gösteren bölgelere ilişkin sayısal veriler

Karşılaştırma	DMR (Differentially methylated regions) sayısı	Hipermetile bölge sayısı	Hipometile bölge sayısı
to vs ts	58	20	38
to-p vs kontrol	452	98	354
to-s vs kontrol	614	430	184
to vs kontrol	415	109	306
ts vs kontrol	377	49	328

to-p: tedavi öncesi (eşli), ts:tedavi sonrası, to-s: tedavi öncesi (tek)

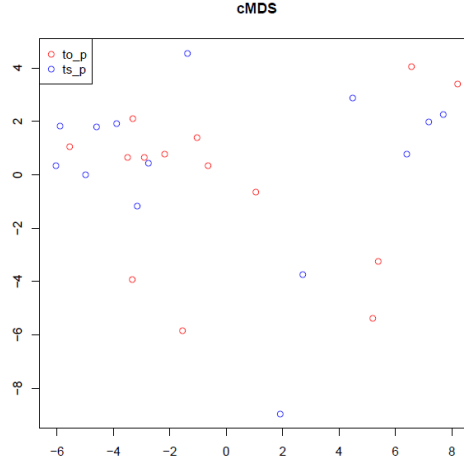
- **Tedavi öncesi ve sonrası (to vs ts)** karşılaştırmasında kalite kontrol aşamasında elenen örnekler çıkarıldıktan sonra kalan 14 hastanın tedavi öncesi ve tedavi sonrası metilasyon profili karşılaştırılarak hipometile edici ajan 5-azasitidin'in etki gösterdiği kromozom bölgeleri ve bu bölgelerde lokalize olan genler belirlenmiştir. Bu çerçevede karşılaştırmada **58** farklı metilasyon gösteren bölge (DMR) tespit edilmiştir. DMR sayısının az olması ilacın az sayıda gen üzerinde minimal bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur.
- **Tedavi öncesi (eşli) ve kontrol (to-p vs kontrol)** örneklerinin karşılaştırmasında kalite kontrol aşamasında 3 örnek analizden çıkarılmış ve 15 tedavi öncesi (eşli) örnek ve 5 kontrol örneği üzerinden analize devam edilmiştir. Tedavi öncesi metilasyon profili sağlıklı kontrol örnekleriyle kıyaslanarak anormal metilasyonun bu hasta profilinde hangi genler üzerinde etki gösterdiği belirlenmeye çalışılmıştır. Yine metilasyon paterni sağlıklı bireylere göre farklılık gösteren bu genlerin hastalığın oluşum sürecindeki etkisi, bulunduğu yollar ve hastalığın patogenezinde nasıl bir rol oynadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu iki grupta metilasyon profili kıyaslandığında **452** farklı metilasyon gösteren bölge (DMR) tespit edilmiştir.
- **Tedavi öncesi (tek) ve kontrol (to-s vs kontrol)** örneklerinin karşılaştırmasında sadece tedavi öncesi kemik iliği örneği alınan ancak 4. kür tedaviye ulaşmadan tedavi sürecinde kaybedilen hastalar çalışılmıştır. Sadece tedavi öncesi örneği bulunan 15 hastanın metilasyon analizi gerçekleştirilmiş olup, 9 hastaya ait array kalite kontrol aşamasında elenerek biyoinformatik analizden çıkarılmış ve ileriki analiz basamakları gerçekleştirilmiştir. Sadece tedavi öncesi bulunan örneklerin

tedavi sürecini tamamlayamadan kaybedilmesi hastalığın daha ağır bir klinik tablo sergilemesi ve aynı zamanda bu hastaların metilasyon paterninin de tedaviden fayda gören hastalardan farklı olacağı düşüncesiyle bu karşılaştırma yapılarak iki grup hasta profilinin metilasyon açısından birbirinden ne ölçüde farklılık göstereceği belirlenmek istenmiştir. Bu iki grupta metilasyon profili kıyaslandığında **614** farklı metilasyon gösteren bölge (DMR) tespit edilmiştir.

- **Tedavi öncesi tüm örnekler ve kontrol (to vs kontrol)** örneklerinin karşılaştırmasında 24 tedavi öncesi örnek ve 5 kontrol örneği üzerinden biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu iki grupta metilasyon profili kıyaslandığında **415** farklı metilasyon gösteren bölge (DMR) tespit edilmiştir.
- **Tedavi sonrası ve kontrol (ts vs kontrol)** örneklerinin karşılaştırmasında 15 tedavi sonrası örnek ve 5 kontrol örneği üzerinden biyoinformatik analizler gerçekleştirilmiştir. Tedavi sonrası örneklerin sağlıklı kontrollerle kıyaslanması ile iki grubun metilasyon profili açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede tedaviden sonra ilacın etkisiyle hastalara ait metilasyon profilinin sağlıklı kontrole ne derece yaklaştığı ve ne ölçüde benzerlik gösterdiği ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu iki grupta metilasyon profili kıyaslandığında **377** farklı metilasyon gösteren bölge (DMR) tespit edilmiştir.

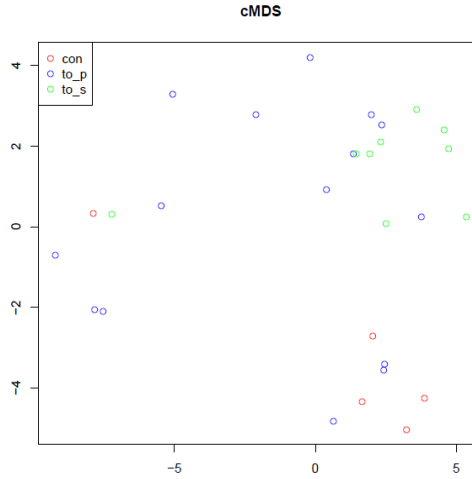
5.7.4. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerine Ait Çok Boyutlu Ölçekleme Analizi Sonuçları

Çok boyutlu ölçekleme (MDS), veri setinde her bir bileşenin birbirine benzerliğini görselleştirmek için kullanılan bir tekniktir. Bu algoritma her nesnenin birbirine göre uzaklığını belirlemektedir. Nesnelere arasındaki benzerliğin/farklılığın altında yatan boyutları araştırmak için kullanılmaktadır. Hem metrik hem de metrik olmayan değişkenlere uygulanabilmektedir. Oluşturulan grafik bir, iki, üç veya daha fazla boyut içerebilmektedir.



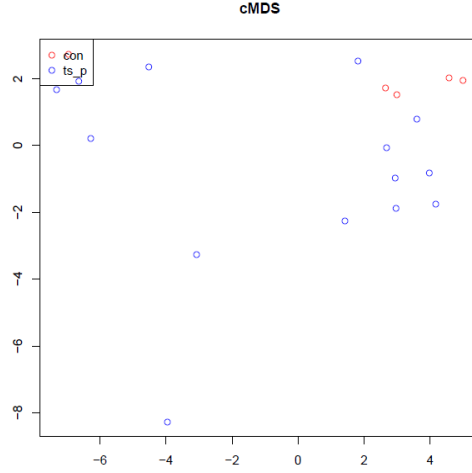
Şekil 5. 16. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında en değişken 10^5 prob kullanılarak elde edilen çok boyutlu ölçekleme grafiği

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında örnekler bütünüyle birbirinden ayrılmamaktadır. Tedavi öncesi ve sonrası gruplardaki her bir örneğin kendi içinde birbirine yakın mesafelerde olması beklenirken böyle bir ayrım görülmemiştir.



Şekil 5. 17. Tedavi öncesi ve kontrol karşılaştırmasında en değişken 10^5 prob kullanılarak elde edilen çok boyutlu ölçekleme grafiği

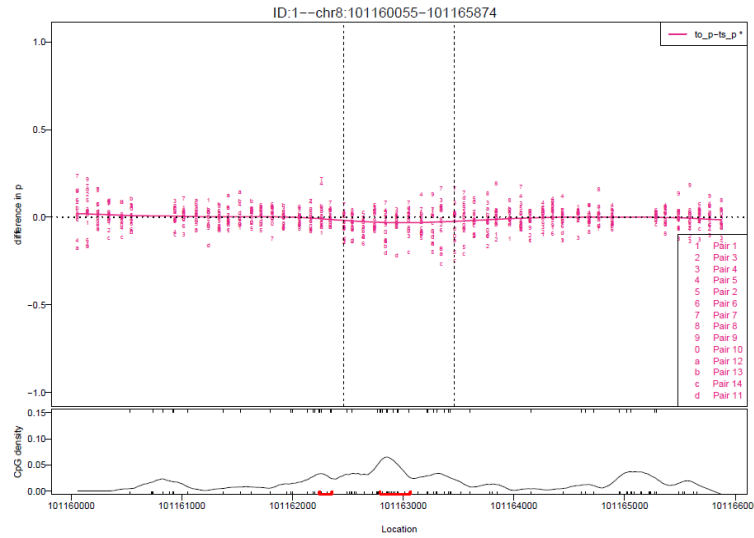
Tedavi öncesi (eşli) ve kontrol örnekleri içinden birer örnek diğer örneklerden farklılık göstermektedir.



Şekil 5. 18. Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında en değişken 10^5 prob kullanılarak elde edilen çok boyutlu ölçekleme grafiği

Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında ise yine kontrol örneklerinden biri haricinde diğerleri birbirine yakın konumlanmıştır. Tedavi sonrası örnekler içinde ise birbirine yakın olan örnekler bulunmasına karşın bunlara uzak olan örnekler de bulunmaktadır. Tedavi sonrası örnekler metilasyon açısından farklılık göstermektedir.

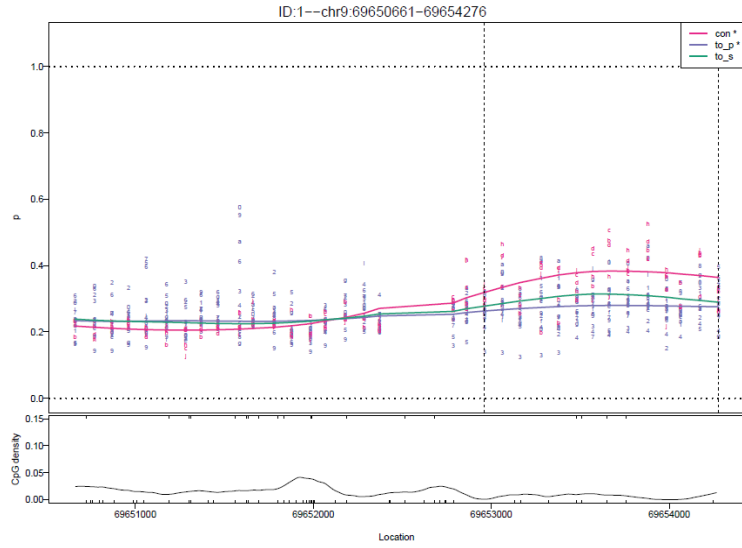
5.7.5. Farklı Metilasyon Gösteren Kromozom Bölgelerinin (DMR) Grafikselleştirilmesi



Şekil 5. 19. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında DMR olarak belirlenen 8. kromozomda bulunan bölgenin grafikselleştirilmesi

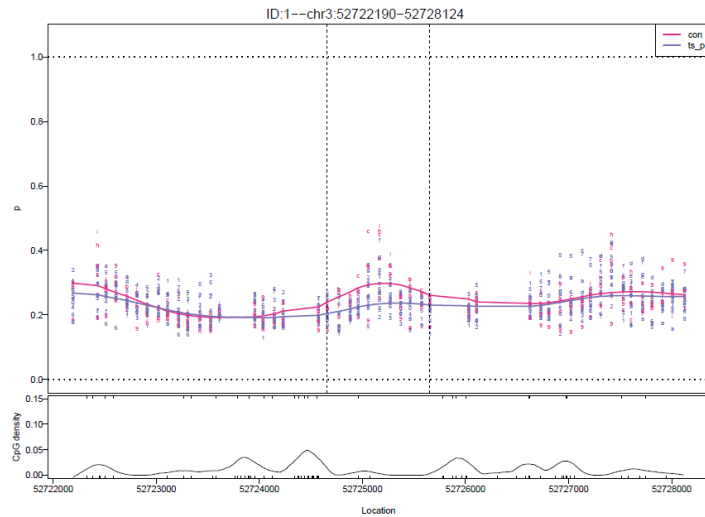
Grafik, ilgili bölgenin her bir örnek için tedavi öncesinde ve sonrasındaki metilasyon farkını göstermektedir. DMR olarak tanımlanan bölgede örnekler arası metilasyon farkı

düşük görünmektedir. Grafiğin alt kısmına bakıldığında bu bölgedeki CpG yoğunluğunun yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 5. 20. Tedavi öncesi ve kontrol karşılaştırmasında DMR olarak belirlenen 9. kromozomda bulunan bölgenin grafiksel gösterimi

Grafik, 9. kromozomda DMR olarak belirlenen bölgenin tedavi öncesi (eşli), tedavi öncesi (tek) ve kontrol örnekleri olmak üzere metilasyon değerlerini göstermektedir. Gruplara ait eğrilere bakıldığında değerler açısından belirgin bir farklılık olduğu görülmektedir. Metilasyon değerleri açısından farklı bulunan bu bölgede ise CpG yoğunluğu düşüktür.



Şekil 5. 21. Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında DMR olarak belirlenen 3. kromozomda bulunan bölgenin grafiksel gösterimi

Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında ise 3. kromozomda DMR olarak tanımlanan bölgeye ait grafik (Şekil 5.21) tedavi sonrası ve kontrol örnekleri arasında metilasyon açısından farklılık olduğunu göstermektedir. Bu bölgede de CpG yoğunluğu düşük görülmektedir.

5.7.6. Farklı Metilasyon Gösteren Genlere İlişkin Gen Ontoloji ve Yolak Analizleri

Bioconductor/R platformunda CHARM algoritması kullanılarak her bir karşılaştırma için farklı metilasyon gösteren bölgeler tanımlanmıştır. Bu kromozom bölgelerinde bulunan genler belirlendikten sonra Biomart veritabanı kullanılarak ilgili genlerin Ensemble ID'leri alınmıştır. Gen ontoloji ve yolak analizleri ise DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) yazılımı (versiyon 6.7) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı karşılaştırmalardan elde edilen toplam küme sayısı ve zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan küme sayısı Çizelge 5.11'de görülmektedir.

Çizelge 5. 11. Karşılaştırmalar ve anotasyon küme sayıları

Karşılaştırma	Cluster Sayısı	Enrichment skoru ≥ 1.3 olan cluster sayısı
to vs ts	13	1
to-p vs kontrol	65	4
to-s vs kontrol	101	2
to vs kontrol	64	5
ts vs kontrol	73	4

DAVID yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen fonksiyonel anotasyon kümeleme analizi sonucunda elde edilen kümeler, bu kümelerde yer alan genler ve metilasyon analizi ile genlere ait belirlenen metilasyon değerleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir. Çizelgelerde zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan kümeler ve aynı zamanda skoru 1.3'ten küçük olmakla birlikte literatür bilgisi dahilinde MDS ve AML patogenezinde önemli olabileceği düşünülen ontoloji terimlerinin temsil ettiği kümeler de bulunmaktadır.

Çizelgelerde verilen **p1**: 1. grup için ortalama metilasyon yüzdesi, **p2**: 2. grup için ortalama metilasyon yüzdesi, **diff**: DMRler arasındaki ortalama yüzde metilasyon farkı, **ttarea**: DMR'deki toplam prob sayısının gruplar arasındaki fark için t istatistiği ortalaması ile çarpımını ifade etmektedir.

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizi sonucunda elde edilen anotasyon kümeleri Çizelge 5.12’de görülmektedir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan tek küme 7 genin bulunduğu membran fraksiyonu terimi ile temsil edilen kümedir. Zenginleşme skoru 1.3’ten küçük olan demir iyonu bağlama, DNA bağımlı transkripsiyon ve apoptozis regülasyonu ile isimlendirilen gen ontoloji grupları da MDS patogenezinde önemlidir.

Çizelge 5. 12. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları

Terim	Zenginleşme Skoru	Gen sayısı	Gen	p1	p2	ttarea	diff
membrane fraction	1.42	7	CLMP	0.27	0.33	33.68	-0.06
			CD68	0.29	0.23	29.09	0.06
			SPCS3	0.26	0.32	19.38	-0.06
			CYP2R1	0.28	0.34	19.32	-0.07
			DHRS9	0.28	0.22	19.54	0.06
			RAPGEF4	0.26	0.31	44.16	-0.05
			TBXAS1	0.25	0.30	31.03	-0.05
iron ion binding	1.06	3	CYP2R1	0.28	0.34	19.32	-0.07
			BCO2	0.25	0.30	19.80	-0.06
			TBXAS1	0.25	0.30	31.03	-0.05
transcription, DNA-dependent	0.78	3	TAF1A	0.31	0.37	20.18	-0.05
			NFATC3	0.28	0.35	43.24	-0.06
			POLR2K	0.24	0.30	20.00	-0.06
positive regulation of apoptosis	0.56	3	MAP3K5	0.30	0.35	20.09	-0.06
			CASP4	0.25	0.31	34.34	-0.05
			NDUFS3	0.26	0.31	25.10	-0.05
regulation of apoptosis	0.43	4	MAP3K5	0.30	0.35	20.09	-0.06
			CFL1	0.30	0.23	30.45	0.07
			CASP4	0.25	0.31	34.34	-0.05
			NDUFS3	0.26	0.31	25.10	-0.05

Tedavi öncesi (eşli) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizi sonucunda elde edilen anotasyon kümeleri Çizelge 5.13'te görülmektedir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan 3 küme bulunmaktadır. Bu kümeler GTPaz bağlama, oksijen taşıma ve replizom terimleriyle temsil edilmektedir.

Çizelge 5. 13. Tedavi öncesi (eşli) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları

Terim	Zenginleşme Skoru	Gen sayısı	Gen	p1	p2	ttarea	diff
GTPase binding	1.78	7	ALS2CL	0.28	0.33	84.07	-0.05
			SYTL2	0.26	0.31	28.61	-0.06
			EXOC2	0.25	0.19	37.36	0.06
			RPH3A	0.27	0.32	77.55	-0.06
			ROCK1	0.27	0.34	28.15	-0.07
			INF2	0.25	0.30	49.37	-0.05
			RPH3AL	0.26	0.32	27.76	-0.06
oxygen transport	1.45	3	HBG2	0.25	0.32	31.11	-0.07
			IPCEF1	0.22	0.17	37.33	0.05
			MB	0.26	0.32	31.62	-0.06
replisome	1.31	3	PURA	0.27	0.33	36.91	-0.06
			POLD3	0.24	0.30	28.48	-0.05
			HELB	0.28	0.34	29.00	-0.06
erythrocyte differentiation	1.09	3	ID2	0.25	0.19	45.47	0.06
			MB	0.26	0.32	31.62	-0.06
			CEBPG	0.28	0.34	57.47	-0.06
Nerve growth factor pathway (NGF)	1.08	3	ELK1	0.29	0.36	27.97	-0.07
			FOS	0.26	0.32	68.95	-0.06
			SOS1	0.28	0.34	78.79	-0.06
negative regulation of transcription	0.68	15	PRDM1	0.25	0.20	99.42	0.05
			NACC2	0.29	0.36	35.90	-0.07
			TBX3	0.27	0.33	93.67	-0.06
			HEY1	0.26	0.32	71.02	-0.06
			TBL1XR1	0.26	0.33	27.61	-0.07
			HDAC9	0.25	0.20	40.69	0.05
			PURA	0.27	0.33	36.91	-0.06
			NRIP1	0.26	0.31	59.00	-0.06
			RFX5	0.26	0.32	28.26	-0.06
			ZC3H8	0.28	0.37	54.91	-0.09
			ID2	0.25	0.19	45.47	0.06
			ALX1	0.26	0.31	60.53	-0.06
			DNMT3A	0.27	0.32	112.47	-0.05
SBNO2	0.22	0.28	37.02	-0.06			

			WWTR1	0.23	0.31	29.59	-0.08
positive regulation of cell migration	0.49	4	ONECUT2	0.28	0.22	57.35	0.06
			RRAS2	0.27	0.34	54.33	-0.07
			IGF1	0.30	0.39	93.94	-0.09
			HDAC9	0.25	0.20	40.69	0.05
negative regulation of gene-specific transcription	0.49	3	HEY1	0.26	0.32	71.02	-0.06
			HDAC9	0.25	0.20	40.69	0.05
			TBL1XR1	0.26	0.33	27.61	-0.07
mitosis	0.49	7	PBRM1	0.26	0.32	53.63	-0.06
			TXNL4B	0.24	0.18	78.80	0.06
			WEE2	0.29	0.36	40.75	-0.07
			DSCC1	0.26	0.32	64.11	-0.06
			DCLRE1A	0.28	0.33	94.39	-0.06
			HAUS7	0.25	0.31	37.84	-0.06
			CCNG1	0.21	0.27	28.39	-0.05
M phase of meiotic cell cycle	0.47	4	TEX15	0.29	0.37	36.87	-0.08
			CCNB3	0.31	0.25	44.83	0.06
			SLC26A8	0.28	0.22	45.47	0.06
			MNS1	0.28	0.34	57.31	-0.06
regulation of apoptosis	0.23	17	IL3	0.25	0.31	67.19	-0.06
			TBX3	0.27	0.33	93.67	-0.06
			CEBPG	0.28	0.34	57.47	-0.06
			UACA	0.29	0.36	37.86	-0.07
			TAX1BP1	0.27	0.32	37.20	-0.05
			RB1CC1	0.24	0.19	35.00	0.05
			ADNP	0.28	0.33	36.35	-0.05
			TLR4	0.26	0.31	27.68	-0.05
			ZC3H8	0.28	0.37	54.91	-0.09
			SOS1	0.28	0.34	78.79	-0.06
			IGF1	0.30	0.39	93.94	-0.09
			ARHGEF11	0.23	0.17	37.25	0.05
			PLAGL1	0.25	0.20	29.90	0.05
			TRAF7	0.24	0.18	35.76	0.06
			ROCK1	0.27	0.34	28.15	-0.07
WRN	0.28	0.35	34.93	-0.07			
LGALS1	0.25	0.33	36.48	-0.08			

Tedavi öncesi (tek) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizi sonucunda elde edilen anotasyon kümeleri Çizelge 5.14'te görülmektedir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan 2 küme bulunmaktadır. Skoru 1.3'ten küçük olan ancak mononükleer hücre proliferasyonu, kaspaz aktivitesinin regülasyonu, apoptozis regülasyonu ve hücre aktivasyonunun pozitif regülasyonu gibi önemli ontoloji terimleriyle ifade edilen kümelerin bulunması da dikkat çekmektedir.

Çizelge 5. 14. Tedavi öncesi (tek) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları

Terim	Zenginleşme Skoru	Gen sayısı	Gen	p1	p2	ttarea	diff
positive regulation of macromolecule biosynthetic process	1.52	29	CALR	0.30	0.25	46.24	0.06
			HIPK2	0.22	0.28	49.56	-0.06
			SLC11A1	0.29	0.23	130.78	0.06
			GDF7	0.24	0.29	49.19	-0.05
			NKX2-3	0.28	0.22	40.52	0.06
			CHD8	0.24	0.29	55.90	-0.05
			NR4A3	0.22	0.17	28.89	0.05
			HMGA1	0.26	0.21	71.45	0.05
			ZBTB38	0.29	0.24	48.43	0.06
			ATOH1	0.28	0.21	44.71	0.07
			NKX2-2	0.28	0.22	64.18	0.06
			THRB	0.27	0.21	29.09	0.07
			BLM	0.28	0.23	88.81	0.05
			NFE2L2	0.31	0.24	39.61	0.07
			MAF	0.24	0.30	51.21	-0.06
			ELL3	0.29	0.23	106.87	0.06
			TBR1	0.23	0.18	66.76	0.05
			HOXA7	0.26	0.21	58.21	0.05
			ARHGEF10 L	0.28	0.22	64.59	0.06
			NR1H3	0.33	0.25	58.34	0.08
BCL3	0.29	0.23	38.48	0.05			
NEUROG3	0.27	0.22	78.70	0.05			
BMP4	0.33	0.26	70.02	0.07			
NCOA6	0.35	0.26	36.28	0.08			
RBM4	0.29	0.23	61.90	0.06			
RUNX1	0.30	0.23	28.05	0.06			
SIX2	0.30	0.24	36.44	0.06			
TBX1	0.25	0.20	42.40	0.05			
MAFB	0.26	0.21	91.51	0.05			
Guanine-nucleotide	1.42	6	ARHGEF10 L	0.28	0.22	64.59	0.06

dissociation stimulator, CDC24, conserved site			PLEKHG1	0.25	0.30	93.67	-0.05
			ARHGEF16	0.29	0.22	49.27	0.07
			VAV3	0.24	0.30	48.27	-0.06
			PLEKHG4B	0.24	0.18	53.37	0.06
			PLEKHG5	0.28	0.22	28.35	0.05
mononuclear cell proliferation	0.9	4	SLC11A1	0.29	0.23	130.78	0.06
			DOCK2	0.30	0.39	28.08	-0.09
			HSPD1	0.27	0.21	84.76	0.06
			PRKCD	0.27	0.22	60.94	0.05
ion binding	0.85	133	NOS1	0.28	0.22	29.36	0.06
			PLCB4	0.25	0.31	41.63	-0.05
			ADAM21	0.29	0.35	35.84	-0.06
			ZNF519	0.28	0.22	67.02	0.06
			S100A6	0.30	0.24	81.57	0.06
			LTN1	0.28	0.22	63.15	0.06
cell activation during immune response	0.72	3	SLC11A1	0.29	0.23	130.78	0.06
			NKX2-3	0.28	0.22	40.52	0.06
			BCL3	0.29	0.23	38.48	0.05
leukocyte mediated immunity	0.42	4	SLC11A1	0.29	0.23	130.78	0.06
			HSPD1	0.27	0.21	84.76	0.06
			PRKCD	0.27	0.22	60.94	0.05
			BCL3	0.29	0.23	38.48	0.05
positive regulation of mononuclear cell proliferation	0.24	3	ZAP70	0.24	0.31	39.30	-0.06
			BLM	0.28	0.23	88.81	0.05
			CD38	0.28	0.23	29.32	0.05
regulation of phospholipase activity	0.24	3	S1PR4	0.31	0.24	28.59	0.07
			GRM5	0.22	0.30	80.40	-0.07
			PTH1R	0.28	0.22	51.32	0.06
activation of caspase activity	0.23	3	CASP9	0.24	0.19	46.85	0.06
			HSPD1	0.27	0.21	84.76	0.06
			CASP8AP2	0.29	0.23	47.43	0.06
negative regulation of apoptosis	0.16	10	PTCRA	0.27	0.21	45.97	0.05
			HIPK2	0.22	0.28	49.56	-0.06
			PCGF2	0.28	0.23	68.00	0.06
			CBX4	0.28	0.21	58.99	0.07
			HSPD1	0.27	0.21	84.76	0.06
			DLX1	0.28	0.22	68.25	0.06
			PDE3A	0.24	0.32	46.61	-0.07
			BCL3	0.29	0.23	38.48	0.05
			CHD8	0.24	0.29	55.90	-0.05
BDNF	0.30	0.24	28.84	0.07			
positive	0.15	4	ZAP70	0.24	0.31	39.30	-0.06

regulation of cell activation			HSPD1	0.27	0.21	84.76	0.06
			BLM	0.28	0.23	88.81	0.05
			CD38	0.28	0.23	29.32	0.05

Tedavi öncesi tüm örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizi sonucunda elde edilen anotasyon kümeleri Çizelge 5.15'te görülmektedir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan 5 küme bulunmaktadır. Skoru 1.3'ten küçük olan ancak eritrosit farklılaşması, hücre döngüsü kontrolü, transkripsiyon ve transkripsiyon faktör aktivitesinin regülasyonu, apoptozis regülasyonu, hemopoiezis, hücre göçü regülasyonu gibi önemli ontoloji terimleriyle ifade edilen kümelerin bulunması da dikkat çekmektedir.

Çizelge 5. 15. Tedavi öncesi tüm örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları

Terim	Zenginleşme Skoru	Gen sayısı	Gen	p1	p2	ttarea	diff
regulation of glucose metabolic process	2.33	5	PPP1CB	0.28	0.34	39.19	-0.07
			PRKAG1	0.24	0.31	26.98	-0.07
			IGF1	0.27	0.33	35.95	-0.06
			PGAM1	0.24	0.30	38.01	-0.06
			LEP	0.29	0.23	42.08	0.06
regulation of carbohydrate catabolic process	2.29	4	PPP1CB	0.28	0.34	39.19	-0.07
			PRKAG1	0.24	0.31	26.98	-0.07
			IGF1	0.27	0.33	35.95	-0.06
			PGAM1	0.24	0.30	38.01	-0.06
Guanine-nucleotide dissociation stimulator, CDC24, conserved site	2.16	6	FARP1	0.27	0.37	29.73	-0.10
			PLEKHG4B	0.23	0.18	51.05	0.05
			SPATA13	0.26	0.31	28.29	-0.05
			PLEKHG1	0.24	0.31	68.49	-0.06
			ARHGEF17	0.27	0.33	45.83	-0.05
PAK-box/P21-Rho-binding	1.38	3	WASL	0.28	0.34	90.86	-0.05
			PAK2	0.30	0.40	30.38	-0.10
			CDC42SE2	0.27	0.32	49.49	-0.05
Heat shock protein 70	1.37	3	HSPA6	0.25	0.20	28.74	0.05
			HSPA2	0.20	0.25	34.36	-0.05
			HSPH1	0.28	0.23	30.35	0.05
erythrocyte differentiation	1.18	3	ID2	0.29	0.36	61.59	-0.08
			SP1	0.23	0.29	36.14	-0.06
			CEBPG	0.24	0.29	53.79	-0.05
cell cycle	0.95	4	PCBP4	0.27	0.22	27.22	0.05

checkpoint			ATM	0.28	0.22	45.04	0.06
			FOXO4	0.25	0.18	37.25	0.07
			FAM175A	0.27	0.32	79.01	-0.05
negative regulation of transcription, DNA-dependent	0.43	8	PRDM1	0.28	0.34	68.03	-0.06
			CBX4	0.27	0.21	54.61	0.06
			RFX5	0.27	0.32	53.13	-0.05
			ID2	0.29	0.36	61.59	-0.08
			SIM2	0.23	0.18	44.21	0.05
			DLX1	0.27	0.21	28.16	0.06
			HDAC9	0.28	0.33	44.85	-0.05
			NEDD4	0.27	0.34	29.25	-0.07
negative regulation of transcription factor activity	0.4	3	SIVA1	0.26	0.21	47.74	0.05
			ID2	0.29	0.36	61.59	-0.08
			CEBPG	0.24	0.29	53.79	-0.05
regulation of innate immune response	0.36	3	MICA	0.27	0.22	36.91	0.05
			CLEC7A	0.27	0.33	38.58	-0.05
			IL21	0.27	0.32	34.83	-0.05
cell activation	0.36	6	IFNAR1	0.28	0.36	37.25	-0.07
			MICA	0.27	0.22	36.91	0.05
			CLEC7A	0.27	0.33	38.58	-0.05
			DOCK2	0.29	0.36	41.97	-0.07
			HDAC9	0.28	0.33	44.85	-0.05
			CEBPG	0.24	0.29	53.79	-0.05
hemopoiesis	0.29	6	CDC42	0.25	0.32	46.66	-0.08
			DOCK2	0.29	0.36	41.97	-0.07
			ID2	0.29	0.36	61.59	-0.08
			SP1	0.23	0.29	36.14	-0.06
			HDAC9	0.28	0.33	44.85	-0.05
			CEBPG	0.24	0.29	53.79	-0.05
negative regulation of apoptosis	0.19	7	BIRC3	0.28	0.35	27.73	-0.07
			ESR1	0.28	0.35	29.01	-0.07
			TAX1BP1	0.25	0.31	28.39	-0.06
			ATM	0.28	0.22	45.04	0.06
			CBX4	0.27	0.21	54.61	0.06
			IGF1	0.27	0.33	35.95	-0.06
			DLX1	0.27	0.21	28.16	0.06
regulation of cell migration	0.18	4	DRD2	0.28	0.23	27.15	0.05
			IGF1	0.27	0.33	35.95	-0.06
			HDAC9	0.28	0.33	44.85	-0.05
			ABHD2	0.25	0.31	63.25	-0.06
positive regulation of apoptosis	0.16	8	SIVA1	0.26	0.21	47.74	0.05
			ARHGEF17	0.27	0.33	45.83	-0.05

			PCBP4	0.27	0.22	27.22	0.05
			ATM	0.28	0.22	45.04	0.06
			ARHGEF11	0.26	0.32	27.81	-0.05
			ZC3H8	0.27	0.32	27.18	-0.05
			CEBPG	0.24	0.29	53.79	-0.05
			CASP8AP2	0.29	0.23	38.13	0.06
regulation of apoptosis	0.14	14	ESR1	0.28	0.35	29.01	-0.07
			ARHGEF17	0.27	0.33	45.83	-0.05
			PCBP4	0.27	0.22	27.22	0.05
			CBX4	0.27	0.21	54.61	0.06
			CEBPG	0.24	0.29	53.79	-0.05
			CASP8AP2	0.29	0.23	38.13	0.06
			SIVA1	0.26	0.21	47.74	0.05
			BIRC3	0.28	0.35	27.73	-0.07
			TAX1BP1	0.25	0.31	28.39	-0.06
			ATM	0.28	0.22	45.04	0.06
			ZC3H8	0.27	0.32	27.18	-0.05
			IGF1	0.27	0.33	35.95	-0.06
			ARHGEF11	0.26	0.32	27.81	-0.05
			DLX1	0.27	0.21	28.16	0.06
negative regulation of transcription	0.12	9	PRDM1	0.28	0.34	68.03	-0.06
			CBX4	0.27	0.21	54.61	0.06
			RFX5	0.27	0.32	53.13	-0.05
			ID2	0.29	0.36	61.59	-0.08
			ZC3H8	0.27	0.32	27.18	-0.05
			SIM2	0.23	0.18	44.21	0.05
			DLX1	0.27	0.21	28.16	0.06
			HDAC9	0.28	0.33	44.85	-0.05
			NEDD4	0.27	0.34	29.25	-0.07

Tedavi sonrası ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizi sonucunda elde edilen anotasyon kümeleri Çizelge 5.16'da görülmektedir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan 4 küme bulunmaktadır. Skoru 1.3'ten küçük olan ancak apoptozis regülasyonu, hücre göçü regülasyonu, hemopoiezis ve gen ekspresyonunun regülasyonu gibi önemli ontoloji terimleriyle ifade edilen kümelerin bulunması da dikkat çekmektedir.

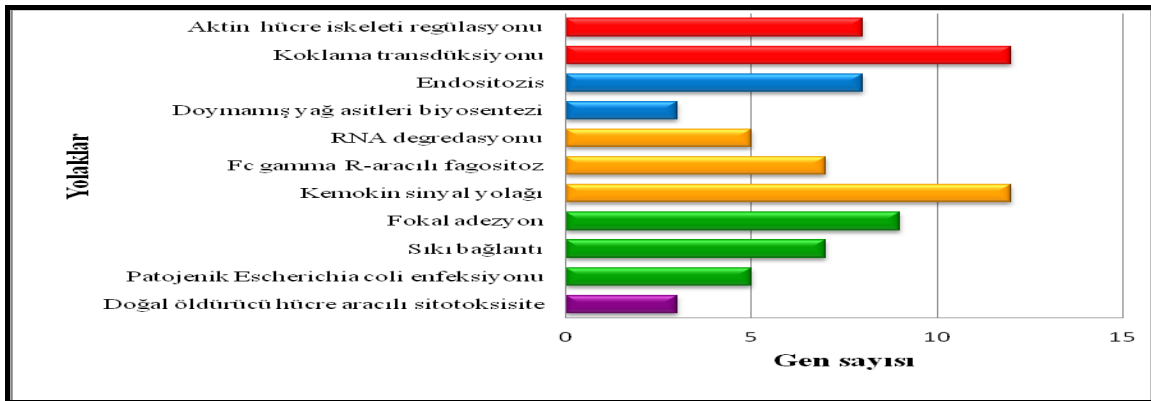
Çizelge 5. 16. Tedavi sonrası ve sağlıklı kontrol karşılaştırması anotasyon kümeleme analizi sonuçları

Terim	Zenginleşme Skoru	Gen sayısı	Gen	p1	p2	ttarea	diff
defense response to bacterium	1.99	6	DCD	0.24	0.32	34.49	-0.08
			DEFB108B	0.27	0.34	49.05	-0.07
			DEFB105B	0.22	0.29	27.04	-0.06
			RNASE3	0.23	0.28	66.98	-0.06
			DEFB104B	0.25	0.34	47.66	-0.09
			DEFB1	0.25	0.31	48.22	-0.06
nucleotide catabolic process	1.79	5	ENPP3	0.25	0.31	32.03	-0.06
			RHOQ	0.26	0.31	56.37	-0.05
			RAB11A	0.25	0.31	48.45	-0.06
			PDE4D	0.23	0.29	53.05	-0.06
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
SPRY-associated	1.64	5	RAB11A	0.25	0.31	48.45	-0.06
			PDE4D	0.23	0.29	53.05	-0.06
			RHOQ	0.26	0.31	56.37	-0.05
			ENPP3	0.25	0.31	32.03	-0.06
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
PAK-box/P21-Rho-binding	1.43	3	WASL	0.27	0.33	54.80	-0.07
			CDC42EP3	0.23	0.29	40.53	-0.06
			PAK2	0.27	0.37	44.74	-0.10
negative regulation of apoptosis	1.1	11	BIRC5	0.22	0.27	43.95	-0.06
			TAX1BP1	0.24	0.29	25.11	-0.05
			FOXO1	0.24	0.29	34.02	-0.05
			RB1CC1	0.21	0.26	32.63	-0.05
			CFL1	0.24	0.31	50.27	-0.07
			APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
			IGF1	0.25	0.31	26.10	-0.07
			HSPA9	0.23	0.29	44.86	-0.05
			TGM2	0.22	0.28	40.78	-0.06

			ATG5	0.26	0.32	87.05	-0.06
negative regulation of cell migration	1.09	4	PTPRM	0.24	0.29	53.73	-0.05
			GREM1	0.25	0.33	43.46	-0.08
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
			ABHD2	0.23	0.29	71.70	-0.06
regulation of cell migration	1.05	7	PTPRM	0.24	0.29	53.73	-0.05
			GREM1	0.25	0.33	43.46	-0.08
			RTN4	0.23	0.28	25.69	-0.06
			APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
			IGF1	0.25	0.31	26.10	-0.07
			ABHD2	0.23	0.29	71.70	-0.06
regulation of apoptosis	0.87	19	RTN4	0.23	0.28	25.69	-0.06
			ARHGEF17	0.26	0.33	29.08	-0.07
			AIFM2	0.24	0.33	27.74	-0.08
			IGF2R	0.23	0.29	26.78	-0.06
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
			TGM2	0.22	0.28	40.78	-0.06
			CEBPG	0.22	0.27	94.75	-0.05
			ATG5	0.26	0.32	87.05	-0.06
			EEF1E1	0.23	0.29	68.78	-0.06
			BIRC5	0.22	0.27	43.95	-0.06
			FOXO1	0.24	0.29	34.02	-0.05
			TAX1BP1	0.24	0.29	25.11	-0.05
			APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			RB1CC1	0.21	0.26	32.63	-0.05
			CFL1	0.24	0.31	50.27	-0.07
			NAE1	0.24	0.30	32.45	-0.06
			IGF1	0.25	0.31	26.10	-0.07
			HSPA9	0.23	0.29	44.86	-0.05
			AHRR	0.25	0.30	26.21	-0.06
M phase of mitotic cell cycle	0.49	6	BIRC5	0.22	0.27	43.95	-0.06
			PAPD7	0.22	0.27	59.88	-0.06
			SEH1L	0.24	0.30	41.80	-0.06
			PBRM1	0.24	0.30	55.37	-0.06
			APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			CD2AP	0.22	0.29	35.46	-0.06
positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle	0.45	3	PSMF1	0.28	0.22	65.12	0.06
			PSMB2	0.26	0.35	67.16	-0.09
			BTRC	0.23	0.29	80.53	-0.06
cell migration	0.42	7	PHOX2B	0.26	0.31	25.86	-0.06

			ASTN1	0.26	0.21	28.50	0.05
			ATOH1	0.24	0.19	26.24	0.05
			TNS3	0.22	0.28	32.42	-0.05
			CFL1	0.24	0.31	50.27	-0.07
			APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			CD2AP	0.22	0.29	35.46	-0.06
positive regulation of apoptosis	0.13	7	ARHGEF17	0.26	0.33	29.08	-0.07
			AIFM2	0.24	0.33	27.74	-0.08
			APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			TGM2	0.22	0.28	40.78	-0.06
			CEBPG	0.22	0.27	94.75	-0.05
			AHRR	0.25	0.30	26.21	-0.06
			EEF1E1	0.23	0.29	68.78	-0.06
hemopoiesis	0.09	4	APC	0.23	0.29	63.94	-0.05
			ADA	0.27	0.22	26.47	0.05
			SOX6	0.22	0.28	45.06	-0.06
			CEBPG	0.22	0.27	94.75	-0.05
negative regulation of gene expression	0.04	5	IRF2	0.20	0.25	35.60	-0.05
			MBD3	0.28	0.23	25.82	0.05
			SOX6	0.22	0.28	45.06	-0.06
			SIM2	0.23	0.18	40.14	0.05
			NEDD4	0.25	0.31	38.53	-0.06

Karşılaştırmalardan elde edilen farklı metilasyon gösteren kromozom bölgelerinde bulunan genler üzerinden DAVID yazılımı kullanılarak gerçekleştirilen yolak analizlerinde 3 veya daha fazla genin bulunduğu yollar dikkate alınmıştır. Buna göre elde edilen yollar ve gen sayıları Şekil 5.22’de görülmektedir. Her bir karşılaştırma için genlerin yoğunlaştığı yollar farklı renkle gösterilmiştir.



Şekil 5. 22. Karşılaştırmalarda öne çıkan yollardaki gen sayıları

kırmızı: ts vs kontrol, mavi: to vs kontrol, sarı: to-s vs kontrol, yeşil: to-p vs kontrol, mor: to vs ts

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında yolak analizleri sonucunda farklı metilasyon gösteren genlerin yoğunlaştığı tek yolak doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksinite yolağıdır. TYROBP, NFAT3 ve PIK3R1 gibi önemli genlerin bulunduğu yolağın fonksiyonel elemanı ve doğal bağışıklığın bir parçasını oluşturan bir çeşit lenfosit hücresi olan doğal öldürücü hücreler bakteri, virüs ya da parazitle enfekte olmuş hücrelerle ya da malignant transformasyonla mücadelede erken evrede rol oynamaktadır.

Çizelge 5. 17. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı

Yolak	Gen sayısı	Genler	Gen sembolü	p1	p2	ttarea	diff
Natural killer cell mediated cytotoxicity	3	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	0.25	0.32	25.98	-0.07
		nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	NFATC3	0.28	0.35	43.24	-0.06
		phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	PIK3R1	0.26	0.31	19.33	-0.06

Tedavi öncesi (eşli) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında yolak analizleri sonucunda farklı metilasyon gösteren genlerin yoğunluk gösterdiği yolaklar Çizelge 5.18’de görülmektedir. Patojenik E.coli, sıkı bağlantı ve fokal adezyon yolakları bu karşılaştırmada öne çıkan yolaklardır.

Çizelge 5. 18. Tedavi öncesi (eşli) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yolaklarda dağılımı

Yolak	Gen sayısı	Genler	Gen sembolü	p1	p2	ttarea	diff
Pathogenic Escherichia coli infection	5	Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	0.23	0.18	28.28	0.05
		cell division cycle 42	CDC42	0.24	0.18	35.88	0.05
		occludin pseudogene	OCLN	0.26	0.32	34.97	-0.05
		similar to Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	0.27	0.34	28.15	-0.07
		toll-like receptor 4	TLR4	0.26	0.31	27.68	-0.05
Tight junction	7	cell division cycle 42	CDC42	0.24	0.18	35.88	0.05
		claudin 11	CLDN11	0.27	0.32	43.81	-0.05
		exocyst complex component 3	EXOC3	0.25	0.33	49.81	-0.08
		myosin, heavy chain 13, skeletal muscle	MYH13	0.26	0.32	52.08	-0.06
		myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	MYH7	0.28	0.34	52.87	-0.06

		occludin pseudogene	OCLN	0.26	0.32	34.97	-0.05
		related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2	RRAS2	0.27	0.34	54.33	-0.07
Focal adhesion	9	ELK1, member of ETS oncogene family	ELK1	0.29	0.36	27.97	-0.07
		cell division cycle 42	CDC42	0.24	0.18	35.88	0.05
		collagen, type III, alpha 1	COL3A1	0.28	0.34	46.73	-0.06
		insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	0.30	0.39	93.94	-0.09
		p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	PAK2	0.29	0.38	28.32	-0.09
		protein phosphatase 1	PPP1CB	0.29	0.42	31.08	-0.13
		similar to Rho associated, coiled-coil containing protein kinase1	ROCK1	0.27	0.34	28.15	-0.07
		son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	SOS1	0.28	0.34	78.79	-0.06
		talin 2	TLN2	0.27	0.33	29.17	-0.06

Tedavi öncesi (tek) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında yolak analizleri sonucunda farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı 3'ün üzerindeki yollardaki dağılımı Çizelge 5.19'da görülmektedir. Kemokin sinyal yolağı, Fc gamma R aracılı fagositoz ve RNA degradasyonu önemli yollardır. Kemokinler, hematopoietik hücrelerde hücrel aktivasyon, farklılaşma ve hayatta kalım gibi biyolojik süreçlerin regülasyonunda rol oynamaktadır.

Çizelge 5. 19. Tedavi öncesi (tek) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yollarda dağılımı

Yolak	Gen sayısı	Genler	Gen sembolü	p1	p2	ttarea	diff
Chemokine signaling pathway	12	Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	0.26	0.35	47.87	-0.09
		adenylate cyclase 4	ADCY4	0.28	0.21	36.68	0.07
		chemokine (C-C motif) ligand 27	CCL27	0.32	0.26	74.37	0.06
		cyclin L2; chemokine (C-C motif) receptor 6	CCNL2	0.23	0.28	35.55	-0.05
		dedicator of cytokinesis 2	DOCK2	0.30	0.39	28.08	-0.09
		guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	GNB5	0.28	0.23	39.17	0.05
		guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8	GNG8	0.29	0.22	29.30	0.07
		neutrophil cytosolic factor 1	NCF1	0.28	0.23	48.35	0.05
		phospholipase C, beta 4	PLCB4	0.25	0.31	41.63	-0.05
		protein kinase C, delta	PRKCD	0.27	0.22	60.94	0.05

		v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	CRKL	0.30	0.24	41.09	0.06
		vav 3 guanine nucleotide exchange factor	VAV3	0.24	0.30	48.27	-0.06
Fc gamma R-mediated phagocytosis	7	JMJD7-PLA2G4B read through transcript; phospholipase A2	JMJD7-PLA2G4B	0.27	0.21	44.81	0.06
		Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	0.26	0.35	47.87	-0.09
		dedicator of cytokinesis 2	DOCK2	0.30	0.39	28.08	-0.09
		neutrophil cytosolic factor 1	NCF1	0.28	0.23	48.35	0.05
		protein kinase C, delta	PRKCD	0.27	0.22	60.94	0.05
		v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	CRKL	0.30	0.24	41.09	0.06
		vav 3 guanine nucleotide exchange factor	VAV3	0.24	0.30	48.27	-0.06
RNA degradation	5	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	CNOT3	0.31	0.24	60.52	0.07
		enolase 2	ENO2	0.24	0.19	43.87	0.05
		exosome component 3	EXOSC3	0.26	0.20	29.63	0.06
		heat shock 60kDa protein 1	HSPD1	0.27	0.21	84.76	0.06
		poly(A) polymerase alpha	PAPOLA	0.31	0.23	29.37	0.08

Tedavi öncesi (tüm) örnekler ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında yolak analizleri sonucunda farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı 3'ün üzerindeki yollardaki dağılımı Çizelge 5.20'de görülmektedir.

Çizelge 5. 20. Tedavi öncesi (tüm örnekler) ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yollarda dağılımı

Yolak	Gen sayısı	Genler	Gen sembolü	p1	p2	ttarea	diff
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	ACOX3	0.27	0.22	57.89	0.05
		bile acid Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	BAAT	0.26	0.31	52.11	-0.05
		fatty acid desaturase 2	FADS2	0.28	0.21	28.15	0.06
Endocytosis	8	G protein-coupled receptor kinase 4	GRK4	0.23	0.17	50.07	0.06
		RAB11A, member RAS oncogene family	RAB11A	0.27	0.33	57.03	-0.06
		cell division cycle 42	CDC42	0.25	0.32	46.66	-0.08
		epsin 3	EPN3	0.28	0.23	29.11	0.05
		heat shock 70kDa protein 2	HSPA2	0.20	0.25	34.36	-0.05
		heat shock 70kDa protein 7 (HSP70B);	HSPA6	0.25	0.20	28.74	0.05
		neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4	NEDD4	0.27	0.34	29.25	-0.07
		programmed cell death 6 interacting protein	PDCD6IP	0.26	0.31	43.75	-0.06

Tedavi sonrası ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında yolak analizleri sonucunda farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı 3'ün üzerindeki yollardaki dağılımı Çizelge 5.21'de görülmektedir.

Çizelge 5. 21. Tedavi sonrası ve sağlıklı kontrol karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren genlerin gen sayısı ≥ 3 olan yollarda dağılımı

Yolak	Gen sayısı	Genler	Gen sembolü	p1	p2	ttarea	diff
Olfactory transduction	12	olfactory receptor, family 2, subfamily A, member 1	OR2A42	0.24	0.31	53.13	-0.07
		olfactory receptor, family 2, subfamily AK, member 2	OR2AK2	0.25	0.32	36.57	-0.07
		olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 6	OR4D6	0.22	0.29	31.63	-0.07
		olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 17	OR4F17	0.31	0.39	58.47	-0.08
		olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 4	OR4F5	0.31	0.39	66.47	-0.08
		olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 5	OR4F4	0.28	0.33	34.91	-0.05
		olfactory receptor, family 4, subfamily M, member 1	OR4M1	0.25	0.30	28.05	-0.06
		olfactory receptor, family 4, subfamily N, member 5	OR4N5	0.26	0.33	25.59	-0.07
		olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 16	OR5D16	0.25	0.31	25.73	-0.06
		olfactory receptor, family 51, subfamily F, member 1	OR51F1	0.28	0.33	32.25	-0.05
		olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 65	OR6C65	0.26	0.31	39.84	-0.05
		olfactory receptor, family 8, subfamily K, member 3	OR8K3	0.25	0.31	40.69	-0.06
		Regulation of actin cytoskeleton	8	Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	0.27	0.33
adenomatous polyposis coli	APC			0.23	0.29	63.94	-0.05
cofilin 1 (non-muscle)	CFL1			0.24	0.31	50.27	-0.07
fibroblast growth factor 14	FGF14			0.24	0.31	35.06	-0.07
fibroblast growth factor 5	FGF5			0.22	0.28	34.77	-0.06
p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2	PAK2			0.27	0.37	44.74	-0.10
platelet derived growth factor D	PDGFD			0.22	0.28	49.44	-0.06
protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	PPP1R12A			0.25	0.30	60.27	-0.05

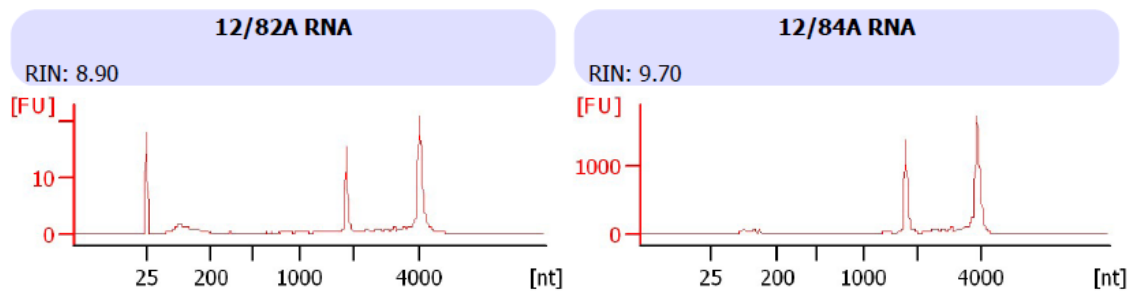
Charm algoritması kullanılarak gerçekleştirilen metilasyon analizi sonucunda tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında hipermetile bulunan genlerin listesi Çizelge 5.22’de verilmiştir. Tedavi öncesinde metilasyon değeri yüksek olan bu genlerin tedavisi sonrasında metilasyonunda azalma olduğu görülmektedir. Bu demetilasyonun kullanılan hipometile edici ajanın ekisiyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Çizelge 5. 22. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında hipermetile bulunan genler

Gen sembolü	Gen tanımı	p1	p2	ttarea	diff
RNF123	ring finger protein 123	0.37	0.28	24.42	0.09
C16orf93	chromosome 16 open reading frame 93	0.31	0.23	19.88	0.08
PIIP5K1	diphosphoinositol pentakisphosphate kinase 1	0.33	0.26	25.65	0.07
CROCCP2	ciliary rootlet coiled-coil, rootletin pseudogene 2	0.36	0.29	19.06	0.07
CTC-501O10.1	novel lincRNA	0.33	0.26	19.75	0.07
CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	0.30	0.23	30.45	0.07
BHLHA9	basic helix-loop-helix family, member a9	0.32	0.25	20.66	0.07
GORAB	golgin, RAB6-interacting	0.32	0.26	19.06	0.06
CD68	CD68 molecule	0.29	0.23	29.09	0.06
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	0.32	0.26	25.98	0.06
DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	0.28	0.22	19.54	0.06
B3GAT2	beta-1,3-glucuronyltransferase 2	0.27	0.21	20.85	0.06
PRPF40B	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog B	0.37	0.31	20.14	0.06
CLEC18C	C-type lectin domain family 18, member C	0.30	0.24	47.77	0.06
PQLC3	PQ loop repeat containing 3	0.29	0.23	30.40	0.05
C21orf62	chromosome 21 open reading frame 62	0.24	0.19	25.46	0.05
RP11-480I12.4	lncRNA (novel protein coding)	0.29	0.24	45.79	0.05
IDH3G	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma	0.22	0.17	29.83	0.05
SYT13	synaptotagmin XIII	0.27	0.22	20.79	0.05
BPIFC	BPI fold containing family C	0.26	0.21	19.29	0.05

5.8. RNA Örneklerinin Bütünlük ve Kalite Analizi

İzole edilen RNA örneklerine ait temsili agilent görüntüsü Şekil 5.23’te verilmiştir.



Şekil 5. 23. İzole edilen RNA örneklerine ait temsili Agilent Bioanalyzer görüntüsü

5.9. Real Time QRT-PCR Sonuçları

Çalışılan primerlere ait amplifikasyon verimi (efficiency) Çizelge 5. 23'te görülmektedir.

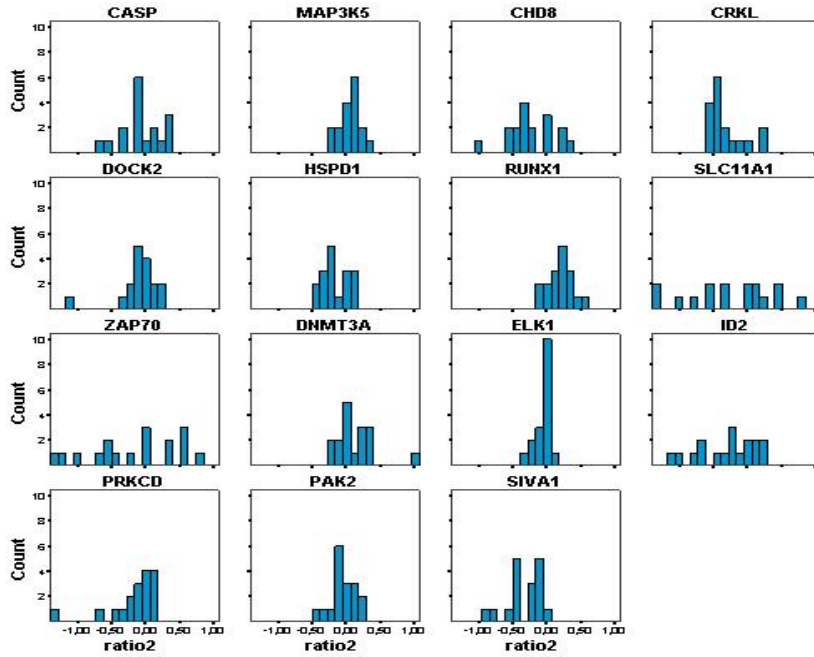
Çizelge 5. 23. Real time QRT-PCR'da kullanılan primerlerin efficiency değerleri

Primer	Verim (efficiency)
CASP4	2
CFL1	2
MAP3K5	1.97
ID2	1.88
ELK1	2
DNMT3A	2
RUNX1	1.89
HSPD1	2
SLC11A1	2
CHD8	1.8
ZAP70	1.89
DOCK2	2
CRKL	2
PRKCD	2
SIVA1	2
CDC42	2
PAK2	1.81
ABL	2
PPIB	1.99
B2M	2

Housekeeping gen olarak belirlenen ABL, PPIB ve B2M genlerinden standart sapması en düşük olan ABL geni kullanılarak gen ifade oranları hesaplanmıştır.

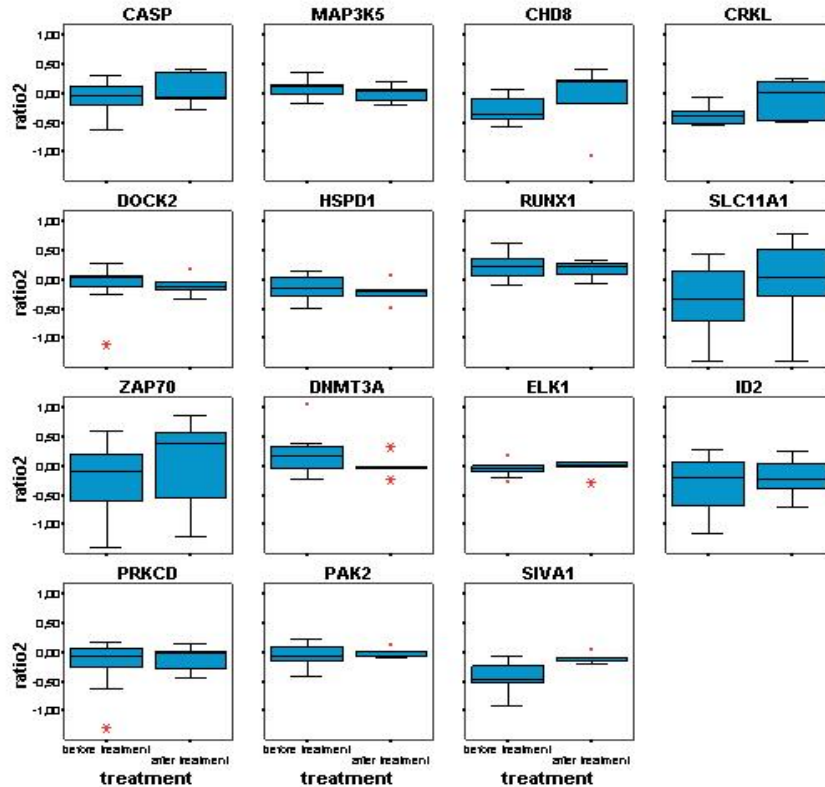
CHARM yöntemi ile genom boyu metilasyon profillerinin tedavi öncesi ve sonrası gruplarda karşılaştırılmasıyla elde edilen istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı metillenme özelliği gösteren bölgelerle ilişkili genler, ontolojik bağlamda dikkate alınarak belirlenmiştir. Metilasyonun gen ifade regülasyonundaki rolü göz önünde bulundurularak, bu bölgelerin gen ifade regülasyonunu etkileme potansiyeli olan genlerin ifadeleri eş zamanlı (Real Time) QRT-PCR ile bağıl olarak nicelenmiştir.

Her bir gen için bağıl gen ifade değerlerinin dağılımı Şekil 5.24'te görülmektedir.



Şekil 5. 24. Bağıl gen ifade oranlarının dağılımı

Her bir gen için tedavi öncesi tüm örnekler ve sonrası gruplarda bağıl gen oranlarının dağılımı incelenmiştir. Buna ilişkin grafikler Şekil 5.25'te görülmektedir.



Şekil 5. 25. Tedavi öncesi ve sonrası her bir genin bağıl ifade oranlarının dağılımı

Bağıl gen ifade değerlerinin tedavi öncesi tüm örnekler ve sonrası arasında anlamlı fark gösterip göstermediği Student's t-test ile araştırılmıştır. Buna göre **CRKL** ve **SIVA1** genlerinin bağıl ifade oranlarının tedavi öncesi örnekler ve sonrasında %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği görülmüştür ($p=0.03$; $p=0.001 < 0.05$). Sonuçlar Çizelge 5.24'te görülmektedir.

Çizelge 5. 24. Bağıl gen ifade değerlerinin tedavi öncesi tüm örnekler ve tedavi sonrası grup arasında istatistiksel anlamlılığı

	Tedavi Öncesi			Tedavi Sonrası			p	ttarea
	ortalama	ortalama std hata	CI	ortalama	ortalama std hata	CI		
CASP4	0.97	0.15	0.63;1.31	1.38	0.4	0.26;2.51	0.37	34.34
MAP3K5	1.29	0.13	1.01;1.59	1.3	0.42	0.12;2.48	0.28	20.09
CHD8	0.58	0.09	0.37;0.78	1.3	0.42	0.12;2.48	0.16	55.9
CRKL	0.43	0.47	0.33;0.54	1.01	0.3	1.73;1.84	0.03	41.09
DOCK2	0.99	0.13	0.7;1.28	0.86	1.85	0.35;1.38	0.91	28.08
HSPDI	0.81	0.09	0.6;1.03	0.68	0.15	0.25;1.12	0.48	84.76
RUNX1	1.83	0.27	1.2;2.43	1.55	0.22	0.93;2.18	0.64	28.05
SLC11A1	0.81	0.25	0.25;1.38	2.16	1.09	0.87;5.18	0.29	130.78
ZAP70	1.23	0.39	0.36;2.09	2.73	1.3	0.909;6.35	0.62	39.30
DNMT3A	2.32	0.91	0.32;4.33	1.11	0.25	0.4;1.81	0.19	112.47
ELK1	0.92	0.07	0.77;1.07	0.96	0.12	0.63;1.29	0.85	27.97
ID2	0.73	0.17	0.36;1.1	0.81	0.28	0.01;1.61	0.65	45.47
PRKCD	0.83	0.12	0.56;1.1	0.85	0.18	0.33;1.36	0.66	60.94
PAK2	0.96	0.11	0.71;1.22	0.98	0.107	0.68;1.28	0.61	44.74
SIVA1	0.42	0.65	0.28;0.56	0.82	0.084	0.59;1.05	0.001	47.74
CDC42	0.22	0.44	0.12;0.31	0.6	0.4	-0.52;1.72	0.39	35.88
CFL1	0.22	0.32	0.15;0.29	0.81	0.3	-0.02;1.65	0.12	30.45

Bağıl gen ifade değerlerinin tedavi öncesi ve tedavi sonrası arasında anlamlı fark gösterip göstermediği Student's t-test ile araştırılmıştır. Buna göre **ID2** geninin bağıl ifade oranının tedavi öncesi ve sonrasında %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği görülmüştür ($p=0.003 < 0.05$). Sonuçlar Çizelge 5.25'te görülmektedir.

Çizelge 5. 25. Bağıl gen ifade değerlerinin tedavi öncesi ve tedavi sonrası grup arasında istatistiksel anlamlılığı

	Tedavi Öncesi		Tedavi Sonrası		r (p)	t(4) p	ttarea
	ortalama	ortalama std hata	ortalama	ortalama std hata			
CASP4	1.05	0.12	1.38	0.4	0.31 (0.61)	0.43	34.34
MAP3K5	0.99	0.12	1.03	0.16	0.84(0.07)	0.69	20.09
CHD8	0.45	0.05	1.302	0.42	-0.33(0.39)	0.13	55.9
CRKL	0.4	0.03	1.01	0.3	0.45 (0.44)	0.104	41.09
DOCK2	1.02	0.16	0.86	0.18	0.83 (0.08)	0.19	28.08
HSPDI	0.81	0.18	0.68	0.15	0.85 (0.06)	0.25	84.76
RUNX1	1.49	0.16	1.55	0.23	0.14 (0.82)	0.81	28.05
SLC11A1	0.99	0.51	2.16	1.09	0.98 (0.002)	0.13	130.78
ZAP70	0.77	0.18	2.73	1.31	0.76 (0.13)	0.17	39.3
DNMT3A	1.33	0.32	1.11	0.25	0.93 (0.023)	0.15	112.47
ELK1	0.83	0.08	0.96	0.12	-0.31 (0.61)	0.45	27.97
ID2	1.03	0.26	0.81	0.28	0.99 (0.00)	0.003	45.47
PRKCD	1.03	0.16	0.85	1.85	0.69 (0.19)	0.26	60.94
PAK2	0.84	0.15	0.98	0.11	0.983 (0.08)	0.16	44.74
SIVA1	0.53	0.12	0.82	0.08	0.41 (0.49)	0.06	47.74
CDC42	0.23	0.02	0.60	0.40	-0.02(0.97)	0.41	35.88
CFL1	0.22	0.02	0.81	0.30	-0.35(0.56)	0.13	30.45

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Myelodisplastik sendrom, periferik kanda bir veya daha fazla seride sitopeniye eşlik eden genellikle hiperselüler ya da normoselüler kemik iliği, displazi ile belirlenen anormal hücre morfolojisi ve yüksek oranda akut myeloid lösemiye dönüşüm ile karakterize, hematopoietik kök hücrenin klonal bozukluğudur (246). MDS genetik ve epigenetik değişimlerin etkisiyle klonal gelişim gösteren çok faktörlü ve çok basamaklı bir patogeneze sahiptir. Bugüne dek hastalığın başlangıcı, ilerlemesi ve AML'ye dönüşüm mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yapılan çalışmalarda yüksek işlem hacimli teknolojilerin de kullanımıyla hastalığın teşhisinde ve tedavisinde yön veren bilgiler elde edilmiştir. Araştırmalar neticesinde ortaya konulan bilgiler yeni tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinde önemli bir ivme kazandırmıştır. Hastalığın heterojen ve kompleks doğası gereği hastalara uygulanabilen rutin bir tedavi protokolü bulunmadığı için hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması teşhiste ve teşhis sonrası hastaya özgü tedavi yaklaşımının geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Metilasyon ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi epigenetik mekanizmayı hedefleyen ilaçların MDS ve AML hastaları üzerinde klinik başarı gösterdiği bilinmektedir ancak klinik cevap ve ilaç direncinin altında yatan mekanizma henüz tam anlamıyla aydınlatılmış değildir (247). Bu nedenle çalışmamızda MDS ve AML hastalarında tedavi amaçlı kullanılan ve hipometile edici bir ajan olan 5-azasitidin'in hastalığın patogenezinde etkili olduğu bilinen anormal DNA metilasyonu üzerindeki etkisinin, gerekse global metilasyon üzerindeki etkisinin araştırılması ve yine hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde deregüle olan genlerin bulunduğu yolların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu araştırma kapsamında genom ebadında metilasyon analizi yapmayı mümkün kılan promotor arraylerle 5-azasitidin tedavisi öncesi ve sonrasında hastalardan alınan kemik iliği örnekleri kullanılarak metilasyon profilleri çıkarılmıştır.

Tez çalışmasında yapılan her bir karşılaştırmada farklı metilasyon gösteren bölgede bulunan genler için gen ontoloji, zenginleşme ve yolak analizleri DAVID yazılımı kullanılarak ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Öncelikle fonksiyonel anotasyon kümeleme analizi yapılarak gen setinde genlerin fonksiyonlarına göre nasıl bir dağılım ve zenginleşme gösterdikleri belirlenmiştir. Fonksiyonel kümeleme ve zenginleşme analizleri yapılırken sınıflandırma sıklığı olarak "highest" kullanılmıştır. Yolak analizleri sonucunda

3 ve 3'ün üzerinde gen bulunan yolaklar her bir karşılaştırma için Çizelge 5.17- 5.21'de verilmiştir.

Biyoinformatik analizlerle karşılaştırmalardan elde edilen farklı metilasyon gösteren bölgelere ilişkin sonuçlar ve bu genler üzerinden yapılan gen ontoloji ve yolak analizleri ile elde edilen yolaklar ilgili karşılaştırma başlığı altında literatür eşliğinde değerlendirilecektir. Aynı zamanda yolaklarda yer alan genlerden MDS ve AML patogeneziyle ilişkili bulunan ve/veya kanser oluşum sürecinde etkili olduğu/olabileceği çalışmalarla gösterilmiş olanlar ayrıntılı tartışılacaktır.

6.1. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tedavi öncesinde ve sonrasındaki metilasyon profillerinin karşılaştırılması ile tedavi öncesinde MDS'de varlığı bilinen anormal metilasyonun hangi gen bölgelerini etkilediği, tedavi amaçlı kullanılan ve global bir hipometile edici ajan olan 5-azasitidin'in hangi bölgelerde metilasyonu geri döndürdüğüünün tespit edilmesi amaçlanmıştır.

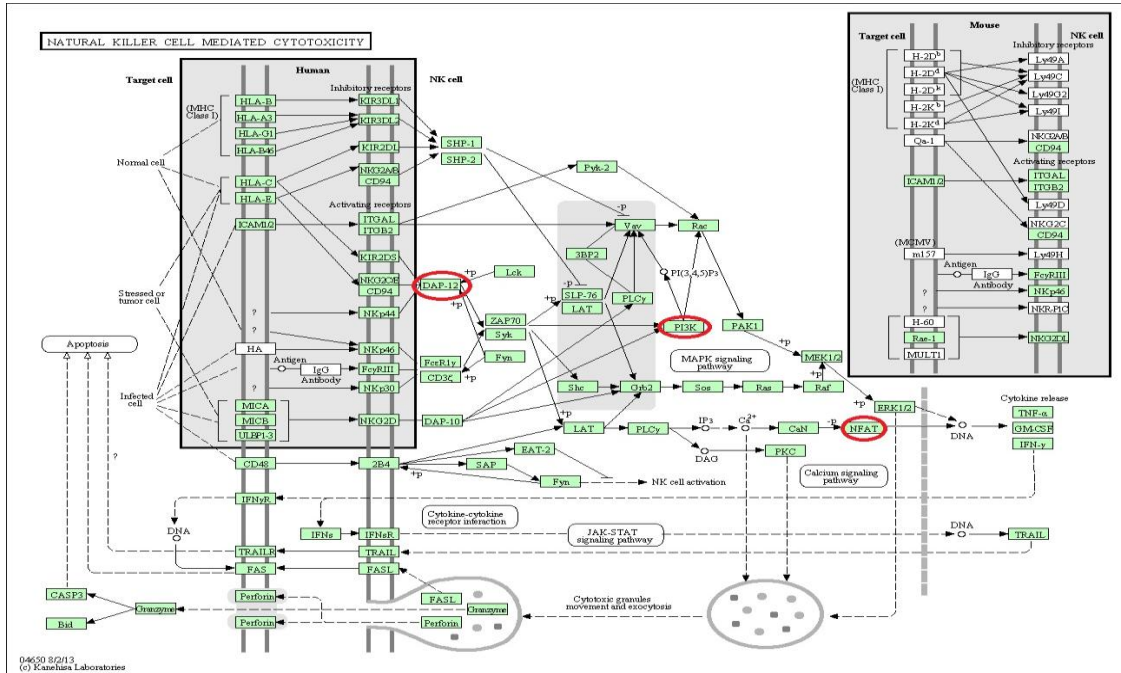
Analizler sonucunda MDS ve MDS-AML hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrası kemik iliği örneklerinin farklı metilasyon profili gösterdiği görülmüştür. 5-azasitidin'in tedavi sonrasında hangi genler üzerinde etki göstererek metilasyon seviyelerinde değişik oranlarda azalma sağladığı belirlenmiştir.

Tedavi öncesi ve 4. kür 5-azasitidin tedavisi sonrası aynı hastalardan alınan kemik iliği örnekleri üzerinden Nimblegen 2.1 Deluxe promotor arrayler kullanılarak gerçekleştirilen genom ebadında metilasyon analizleri sonucunda tedavi öncesi ve sonrası grup arasında istatistiksel olarak anlamlı olan metilasyon değişimleri belirlenmiştir. Charm algoritması ile eşli (pairwise) olarak gerçekleştirilen analizlerde iki grup arasında **58** farklı metilasyon gösteren bölge (DMR-Differentially methylated region) belirlenmiştir. Elde edilen bu bölgeler 58 anote gen ile ilişkilendirilmiştir. MDS ve MDS-AML hastalarında tedavi öncesinde bu genlerden 20'si hipermetile ve 38'i ise hipometile bulunmuştur.

Tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırmasında yapılan fonksiyonel anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizinde bu genler 13 küme oluşturacak şekilde dağılım göstermiştir. Bu

kümeler içinde *membran fraksiyonu, demir iyonu bağlama, DNA bağımlı transkripsiyon ve apoptozis regülasyonu* başlıklı kümeler dikkat çekmektedir.

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmada farklı metilasyon gösteren bölgede bulunan genlerin yolak analizlerinde ise **TYROBP (DAP12)**, **NFATC3** ve **PIK3R1** olmak üzere en fazla genin birlikte bulunduğu tek yolak olan *doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksosite yolağı* ön plana çıkmıştır. Yolakta bulunan üç gen de tedavi öncesinde hipometile bulunmuştur.



Şekil 6. 1. Doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksosite yolağı

Doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK) kemik iliğinden kaynaklanan büyük granüllü lenfositler olup doğal immünitinin en önemli hücreleridir. Yabancı antijenlere karşı ilk basamak savunmada görev alırlar. NK hücreleri, enfekte olmuş ya da malign transformasyona uğramış hücreleri, hücre aracılı sitotoksosite ve antikor aracılı hücrel sitotoksosite ile lize uğratabilirler (248). NK hücrelerin in vitro ve in vivoda sitotoksik etkileri interlökin ve interferon gibi sitokinler tarafından artırılabilir. Hayvan çalışmalarında tümör büyüme kontrolü ve metastazda kritik rol oynadıkları, virüs enfeksiyonlarına karşı doğal bağışıklık sağladıkları gösterilmiştir. Aktivasyonu takiben hücrelerden inflamatuvar cevabı indükleyebilen, monosit, dendritik hücre, granülosit büyüme ve farklılaşmasını yönlendiren ve sonradan oluşan adaptif immün cevabı etkileyen sitokin ve kemokinler salınmaktadır. Doğal öldürücü hücrelerin normal hücreleri ve tümör

hücrelerini ayrımının altında yatan mekanizmanın anlaşılması tümör immün takibinde farklı bakış açıları sağlayarak kanser tedavisinde yeni stratejiler geliştirilmesini mümkün kılmaktadır (249). Doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksiste yolağında rol oynayan genlerde oluşabilecek deregülasyon, tümör oluşumu ve ilerleme sürecinde malign hücrelerin parçalanmasında yolağın işleyişini olumsuz etkileyebilir.

Pellagatti ve arkadaşları MDS’de deregüle olan yolakları ve fonksiyonel ontoloji gruplarını belirlemek üzere yaptıkları çalışmalarında 183 MDS hastasından elde edilen CD34+ hematopoietik kök hücreler üzerinden mikrodizinle global gen ekspresyon analizi gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda interferon, trombopoietin, wnt sinyal yolağının da içinde bulunduğu birçok yolakta fonksiyonel olan genlerde görülen artan ve azalan regülasyon neticesinde ilgili genlerin buldukları yolakların bu ekspresyon değişimlerinden etkilendikleri ortaya konmuştur. Aynı zamanda bu çalışmada **doğal öldürücü hücre sinyal yolağında** bulunan **PIK3R3**, FCGR3B, PTPN6, RRAS2, **TYROBP**, SOS1, PRKCZ ve PRKCA genlerinin ifadesinin artmış olduğu da tespit edilmiştir (250). Doğal öldürücü hücre sinyal yolağında yer alan bu genler içinden TYROBP ve PIK3 enzim ailesinde bulunan bir başka gen olan PIK3R1 geni çalışmamızda aynı yolak üzerinde ön plana çıkmıştır. İfadesinin artmış olduğu belirtilen bu genler çalışmamızda tedavi öncesi örneklerde hipometile bulunmuştur. ***Genlerin ifadelerinin artmış olması, hipometile bulunmalarını desteklemektedir.*** Aynı yolakta bulunan iki genin çalışmamızda da tedavi öncesi hasta grubunda tespit edilmesi bu noktada bulguların literatür verileriyle örtüştüğünü göstermektedir. Aynı çalışmada trizomi 8 anomalisi bulunan MDS hastalarının ekspresyon değerleri sağlıklı kontrolle kıyaslandığında en fazla deregülasyon görülen 10 yolağın 6’sında fonksiyonel olan PIK3R1 geninin ekspresyonunun sağlıklı kontrole göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Aynı yolakta bulunan PIK3R1 ve TYROBP genlerinin hem bizim çalışmamızda hem de Pellagatti’nin çalışmasında benzer şekilde davranması bu genlerin terapötik/diagnostik biyobelirteç olarak ileri analizlere alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Diğer yandan bu gen ile ilgili literatüre biraz daha yakından bakmak genin MDS patogenezindeki yerinin anlaşılmasında yararlı olacaktır.

PIK3R1: PIK3, p110 katalitik ve p85 regülatör alt ünitelerden oluşan bir heterodimerdir. PIK3R1 geninin de dahil olduğu fosfaditilinositid 3 kinaz (PIK3) enzim ailesi hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma, motilite (hareketlilik), hayatta kalım ve hücre içi iletim gibi birçok hücrel biyolojik süreçte rol oynamaktadır. Bu süreçlerdeki fonksiyonların çoğu PIK3R1 geninin de bulunduğu sınıf 1 kinazların, protein kinaz B'yi (PKB, AKT) apoptoziste önemli olan bir hücre içi sinyal ileti yolağı olan **PI3K/AKT/mTOR'u** aktive etmeleriyle ilişkilidir (251). Fare modelleri üzerinde gerçekleştirilen biyokimyasal ve genetik çalışmalar PI3K'nın gelişim sürecinde de önemli rollere sahip olduğunu ortaya koymuştur (251-253). Aynı zamanda PI3 kinazlar, ErbB, Ras, PI3K-Akt, VEGF, Jak-STAT, apoptozis, kronik myeloid lösemi, akut myeloid lösemi, kolorektal kanser, endometrial kanser ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi yolakların önemli kilit noktalarında yer almaktadır (254).

Mevcut literatür PI3KR1 ile ilgili bulgumuzu güçlendirmekte/doğrulamaktadır. Kanserlerin geniş bir spektrumunda PI3K-AKT yolağında yer alan çok sayıda genin regülasyonunun bozulduğu bilinmektedir. Bu yolda görevli birçok gende gerçekleşen mutasyonlar ilgili genlerde fonksiyon kaybı ya da kazanımı yoluyla neoplastik transformasyona neden olmaktadır. Bu nedenle PIK3 yolağını hedefleyen terapötik stratejiler geliştirilmektedir (255). Over kanserlerinde PIK3 p85 α 'da mutasyon, p110 α 'da amplifikasyon, sindirim borusu kanserinde PIK3 p85 α 'da mutasyon, meme kanserinde PIK3'te fazla aktivasyon ve lenfoid kanserde de p85-EPH (efrin) füzyonu gibi değişimler tespit edilmiştir (256-259). PIK3'ün biyolojik aktivitesi ve inhibitörleri üzerinde yapılan çalışmalar ışığında PIK3 muhtemel bir antitümör ajan olarak görülmektedir.

Çizelge 5.22'de tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırmasında hipermetile çıkan gen listesinde yer alan genler görülmektedir. Tedavi amaçlı kullanılan 5-azasitidin'in hipometile edici özelliği ile tedavi öncesinde hipermetile olan bu genlerin tedavi sonrasında metilasyon seviyesinin azaldığı düşünülmektedir. İki grup arasında metilasyon farkının en fazla olduğu gen RNF123 genidir. **RNF123** geni, hücre döngüsü progresyonunda fonksiyona sahip olan E3 ubiquitin-protein ligase RNF123 enzimini kodlamaktadır (260). Aynı zamanda gen tarafından kodlanan C-terminal RING finger domainine sahip protein, protein-protein ve protein-DNA interaksiyonlarında rol oynamaktadır. RNF123'ün MDS ya da AML patogeneziyle ilişkili olduğunu gösteren herhangi bir veri bulunmamaktadır.

Hipermetile çıkan diğeri bir gen ise *CFL1* genidir. Öncül T hücreli akut lenfoblastik lösemi/lenfomada gen ekspresyon profillemesi ile potansiyel terapötik hedef olabilecek onkojenik yolların tanımlanması amacıyla yapılan ve SCL-LMO1 transgenik fare modeli üzerinde gerçekleştiren bir çalışmada CFL1 geninin ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir. CFL1 genindeki bu ifade artışının lösemik hücre hattının proliferasyonunda önemli olduğu ve cofilin 1'in defosforilasyonunu indükleyen diğeri mekanizmaların da dahil olduğu bir kaskadın T lenfosit proliferasyonuna yol açtığı vurgulanmaktadır (261).

Myelodisplastik sendromda makrofaj proliferasyonu ve apoptozis arasındaki ilişkiyi açıklamak üzere yapılan bir çalışmada MDS hastalarında CD68 pozitif hücre sayısı ve apoptotik hücre sayısının sağlıklı kontrollere göre daha fazla olduğu görülmüştür. CD68 ekspresyonu ve apoptozisin pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (262). Çalışmamızda tedavi öncesinde hipermetile bulunan *CD68* geninin ekspresyonuna ilişkin veri bulunmadığı için bu noktada hipermetile bulunan genin ekspresyonundaki azalma apoptozisin de azalmasına neden olmak suretiyle hastalığın oluşum sürecinde etkili olabilir şeklinde bir yorum yapılabilir.

IDH3G geni, izositrat dehidrogenaz gama enzimini kodlamaktadır. İzositrat dehidrogenazlar, izositratın oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen enzimlerdir. İnsanlarda IDH1, IDH2 ve IDH3 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Birçok beyin tümöründe IDH1 mutasyonu görülmüştür (263). Sitogenetik olarak normal olan akut myeloid lösemi hastalarının %20'den fazlasında ise IDH1 ve IDH2 mutasyonları bulunmaktadır (100). Çalışmamızda hipermetile bulunan IDH3G geni daha önce MDS ve AML patogeneziyle ilişkilendirilmemiştir. Genle aynı fonksiyona sahip izoformları IDH1/2 genindeki mutasyonlar DNA metilasyonu ve histon modifikasyonunu etkilediği için AML progresyonunda önemli görülmektedir (264). Bu bilgiler çerçevesinde IDH3G geninin de MDS ve AML oluşumunda etkili olabileceği düşünülmektedir.

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında *ID2* geninin bağıl ifade oranının %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği görülmüştür (ID2, p=0.003 <0.05).

ID2 (Inhibitor of DNA Binding 2, Dominant Negative Helix-Loop-Helix) geni tarafından kodlanan protein DNA bağlanma ailesi inhibitörü, helix-loop-helix domainine sahip transkripsiyonel regülatörlerin bir üyesidir. Protein, hücre proliferasyonunun negatif regülasyonundan sorumludur.

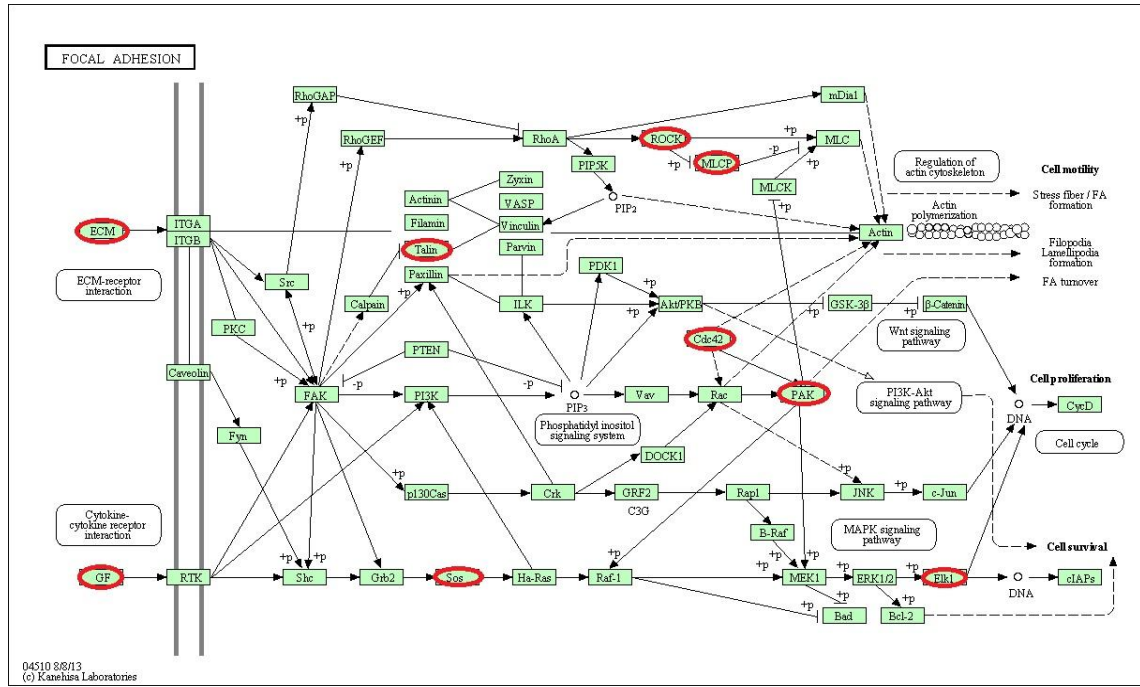
6.2. Tedavi Öncesi (eşli) ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tedavi öncesi (eşli) örnekler ve sağlıklı kontrollere ait metilasyon profilinin karşılaştırılmasıyla anormal metilasyonun bu hasta profilinde hangi genler üzerinde etkili olduğu ve bu genlerin bulunduğu yolaklarda gerçekleşen deregülasyonun hastalığın oluşum ve ilerleme sürecinde nasıl bir rol oynadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Tedavi öncesi (eşli) ve kontrol karşılaştırmasında **452** farklı metilasyon gösteren bölge ve bu kromozom bölgelerinde bulunan genler belirlenmiştir. Belirlenen genler üzerinden yapılan fonksiyonel anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizinde genler 65 küme oluşturacak şekilde dağılım göstermiştir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan anotasyon kümeleri, **GTPaz bağlama, oksijen taşıma ve replizom** gen ontoloji terimleriyle ifade edilmektedir. Bununla birlikte zenginleşme skoru 1.3'ün altında olup MDS patogenezinde önemli olabilecek anotasyon grupları arasında eritrosit farklılaşması, sinir büyüme faktör yolağı, transkripsiyonun negatif regülasyonu, hücre migrasyonunun pozitif regülasyonu, mitoz, mitotik hücre döngüsünün M fazı ve apoptozis regülasyonu gibi gen ontoloji terimleri ile ifade edilen kümeler ön plana çıkmaktadır.

Yolak analizlerinde ise **patojenik Escherichia coli enfeksiyonu, sıkı bağlantı ve fokal adezyon** öne çıkan yolaklardır.

Fokal adezyon yolağında, ELK1, CDC42, COL3A1, IGF1, PAK2, PPP1CB, ROCK1, SOS1 ve TLN2 genleri bulunmaktadır. Fokal adezyonlar, hücre ve ekstraselüler matriks arasında adezyonun (yapışma) kurulduğu yerler olarak tanımlanmaktadır. Hücre iskeleti, proliferasyonu ve yaşamını etkileyen sinyalleşme ağının merkezi olan fokal adezyon bağlantıları, hücre motilitesi, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, gen ekspresyonunun regülasyonu ve hayatta kalma gibi biyolojik süreçlerde önemli rollere sahiptir (265).



Şekil 6. 2. Fokal adezyon yolağı

Fokal adezyon yolağında görevli **ELK1 geni** hücre büyümesi, farklılaşması ve hayatta kalımı regüle eden bir transkripsiyon faktörü olarak görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar genin aynı zamanda gen ekspresyonunun kontrolünde de rol oynadığını göstermiştir (266). Kanser gelişim sürecinde tümör hücrelerinin bazal membrana ve yakındaki dokuların içine doğru göçü olarak tanımlanan invazyon metastatik yayılımda gerçekleşen ilk adımdır. Genom boyu analizler ELK1'in hedefi, hücre göçü ve aktin hücre iskeleti ile ilişkili proteinleri kodlayan genleri (PTGS2, CTGF, HIF1A, ACTB, CDH3, PFN1, LIMA1, IQGAP1 ve ACTN1) açığa çıkarmıştır (267). ELK1'in meme kanserinin hücrel metastazında önemli fonksiyona sahip olduğu düşünülmektedir (268). Bu bilgiler ışığında ELK1 geninin kilit noktadaki görevleri nedeniyle MDS'nin oluşum ve ilerlemesinde etkili olabileceği fikri ortaya çıkmaktadır.

Fokal adezyon yolağında bulunan diğer önemli bir gen olan **CDC42 geni** hücre morfolojisi, migrasyon, endositozis, hücre döngüsü progresyonu gibi farklı hücrel fonksiyonları kontrol eden sinyal yolaklarını regüle etmektedir. MDS'nin hematopoietik patofizyolojisini araştıran bir çalışmada MDS-RA hastalarında genin ekspresyonu yüksek bulunmuştur. Anormal CDC42 ekspresyonunun MDS'de morfolojik displaziye neden olabileceği vurgulanmıştır (269). Çalışmamızda ise kontrolle kıyaslandığında genin tedavi öncesi (eşli) örneklerde metilasyon seviyesi daha yüksek bulunmuş ancak örnekler arasında ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Çeşitli kanserlerde

ekspresyonunda artış görülen CDC42 geni tümör oluşum sürecinde etkilidir ve kanser gelişiminde kompleks bir role sahip olduğu düşünülmektedir (270). Dolayısıyla literatür verileri genin MDS oluşum sürecinde de etkili olabileceğini desteklemektedir.

Fokal adezyon yolağında bulunan *IGF1* geni, fonksiyon ve yapı olarak insüline benzeyen, büyüme ve gelişime aracılık eden protein ailesinin üyesi olan insülin benzeri büyüme faktörü 1'i kodlamaktadır. Gende meydana gelen değişimler protein eksikliğine neden olmaktadır. Chen ve arkadaşlarının MDS'de hastalık spesifik moleküler karakteristikleri belirlemek amacıyla monozomi 7 ve trizomi 8 sitogenetik anomalileri taşıyan MDS hastalarından elde ettikleri CD34 hematopoietik progenitör hücrelerde mikrozinin ile gen ekspresyon analizi yaptıkları çalışmalarında trizomi 8 taşıyan MDS hastalarında IGF geninin ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür (271). Spesifik reseptörü olan IGF1R'ye bağlanarak aktivite gösteren gen AKT sinyal yolağı aktivasyonu, hücre büyüme ve proliferasyonunun stimülasyonu ve programlı hücre ölümü inhibisyonu gibi birçok süreçte etkilidir. Hematopoietik hücre, deri, kemik sinir hücresi gibi birçok hücre tipinin büyüme ve gelişimini regüle etmektedir (272).

6.3. Tedavi Öncesi (tek) ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

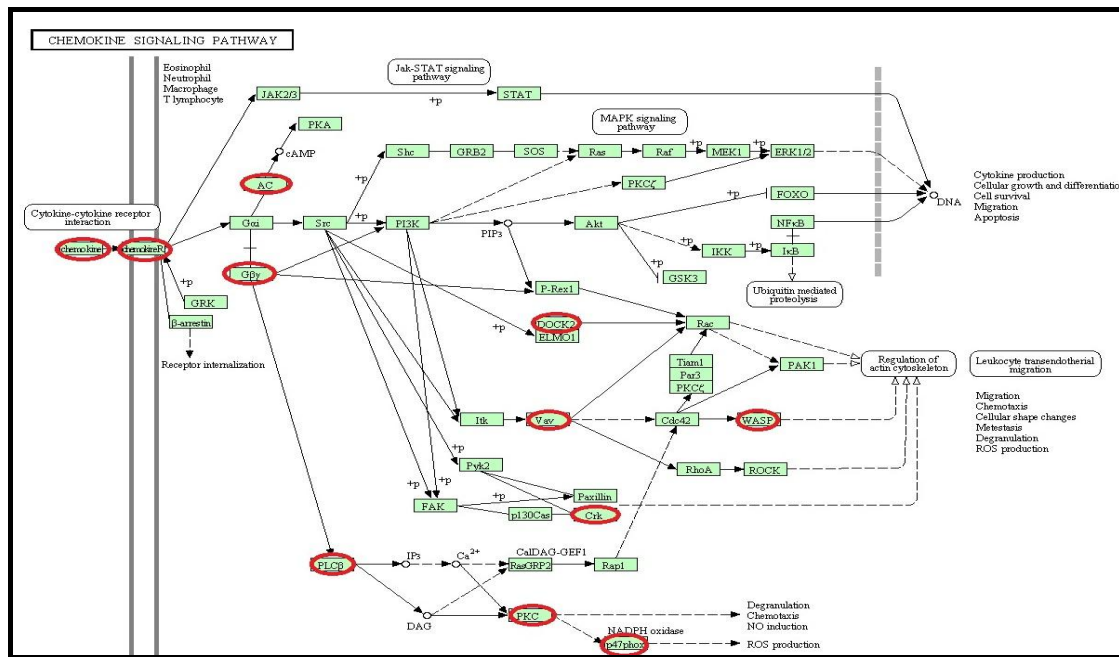
Sadece tedavi öncesi bulunan örneklerle kontrol örneklerine ait metilasyon profilinin karşılaştırılması ile tedavi sürecinde kaybedilen ve daha agresif bir hastalık progresyonuna sahip bu hastalardaki metilasyon değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda sadece tedavi öncesi örneği bulunan bu hastaların tedavi öncesi ve sonrası bulunan örneklerden farklı bir metilasyon paterni gösterdiği düşünülerek iki grup arasındaki farkın da ortaya konması amaçlanmıştır.

Tedavi öncesi (tek) ve kontrol karşılaştırmasında **614** farklı metilasyon gösteren bölge tanımlanmıştır. Belirlenen genler üzerinden yapılan fonksiyonel anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizinde genler 101 küme oluşturacak şekilde dağılım göstermiştir. Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan anotasyon kümeleri, makromolekül biyosentetik prosesinin pozitif regülasyonu ve guanin nükleotid ayırma stimülatörü gen ontoloji terimleriyle ifade edilmektedir. Bununla birlikte zenginleşme skoru 1.3'ün altında olup MDS patogenezinde önemli olabilecek anotasyon grupları arasında mononükleer hücre proliferasyonu, iyon

bağlama, immün cevap sürecinde hücre aktivasyonu, lökosit aracılı immünite ve apoptozis regülasyonu gibi gen ontoloji terimleri ile ifade edilen kümeler de bulunmaktadır.

Yolak analizlerinde ise **kemokin sinyal yolağı**, **RNA degradasyon** ve **Fc gamma R- aracılı fagositoz** genlerin yoğunluk gösterdiği yollar olarak ön plana çıkmıştır.

Kemokin sinyal yolağında WASL, ADCY4, CCL27, CCNL2, DOCK2, GNB5, GNG8, NCF1, PLCB4, PRKCD, CRKL ve VAV3 genleri bulunmaktadır. Kemokinler, 8-10 kilodalton (kd) ağırlığında, aminoasit dizilimlerinde %20-70 oranında benzerlik gösteren proteinlerdir. Yapılarında bulunan sistein (cysteine=C) rezidülerinin yerleşim pozisyonlarına ve genetik yapılarına göre 4 alt gruba ayrılırlar. Hematopoietik hücrelerde hücrel aktivasyon, farklılaşma ve hayatta kalım gibi önemli prosesler kemokinler tarafından regüle edilmektedir. Aynı zamanda kemokinler immün cevapta lökosit göçünü yönlendirmektedir (273). Kemokinlerin lökosit fonksiyonlarında ve buna bağlı olarak birçok hastalığın fizyopatogenezinde önemli bir yere sahip olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (274).



Şekil 6. 3. Kemokin sinyal yolağı

Kemokin sinyal yolağında görevli, heterotrimerik G proteinini kodlayan, GTPaz ve sinyal dönüştürme aktivitesine sahip **GNG8** geni, lökosit transendotelial migrasyonunu kontrol eden ve sinir sistemiyle ilgili değişik çok sayıda yolda rol oynamaktadır. GNG8 geni, huntington hastalığı ve burkitt lenfoma ile ilişkilidir. Sporadik kronik lenfositik

lösemi/küçük lenfositik lenfoma (CLL/SLL) hastalarında G proteinlerinin ve G protein-coupled reseptör sinyal yollarının yüksek relaps oranıyla ilişkili olduğu, hücre migrasyonu ve apoptozisin baskılanmasında da etkili oldukları görülmüştür (275).

Kemokin sinyal yolağında yer alan **PLCB4** geni, fosfolipitleri yağ asitleri ve diğer lipofilik moleküllere hidroliz eden fosfolipaz enzim grubuna dahil olan fosfolipaz C beta 4'ü kodlamaktadır. PLCB enzim ailesinin bir başka üyesi ve yine 20. kromozom üzerinde bulunan PLCB4 genine çok yakın bir bölgede lokalize PLCB1 geninde oluşan delesyonların MDS'den AML'ye progresyonda etkili olduğu düşünülmektedir. Cocco ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 20. kromozomda oluşan yeniden düzenlemelerin bu bölgede bulunan başka hangi genleri etkilediği, bu durumun MDS ve AML patogenezinde nasıl rol oynadığı araştırılmıştır. Aynı bölgede ve PLCB1 genine çok yakın olmasına karşın delesyonun PLCB4 genini etkilemediği görülmüştür (276).

6.4. Tedavi Öncesi (tüm örnekler) ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tedavi öncesi tüm örneklerle kontrol örneklerine ait metilasyon profilinin karşılaştırılması ile hastalıkta değişen metilasyon paterninin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tedavi öncesi tüm örnekler ve kontrol karşılaştırmasında **415** farklı metilasyon gösteren bölge tanımlanmıştır. Belirlenen genler üzerinden yapılan fonksiyonel anotasyon, kümeleme ve zenginleşme analizinde genler 64 küme oluşturacak şekilde dağılım göstermiştir.

Zenginleşme skoru ≥ 1.3 olan anotasyon kümeleri, glukoz metabolik proses regülasyonu, karbonhidrat katabolik proses regülasyonu, guanin nükleotid ayırma stimülatörü, PAK-box/p21-Rho bağlama, Heat shock protein 70 gen ontoloji terimleriyle ifade edilmektedir. Bununla birlikte zenginleşme skoru 1.3'ün altında olup MDS patogenezinde önemli olabilecek anotasyon grupları arasında eritrosit farklılaşması, hücre döngüsü kontrol noktası, apoptozis, hemopoiezis gibi gen ontoloji terimleri ile ifade edilen kümeler de bulunmaktadır.

Yolak analizlerinde ise **doymamış yağ asitleri biyosentezi** ve **Endositozis** yolları, genlerin yoğunluk gösterdiği yollar olarak öne çıkmıştır.

Endositozis yolağında GRK4, RAB11A, CDC42, EPN3, HSPA2, HSPA6, NEDD4 ve PDCD6IP genleri bulunmaktadır. Endositozis, ligandların, besinlerin, plasma membran proteinlerinin ve lipidlerin hücre yüzeyinden hücre içerisine taşınmasıdır. Endositoz yolağında görevli, RAS ilişkili GTP-bağlama proteinini kodlayan **RAB11A** geninin tümörigeneziste rol oynayabileceği düşünülmektedir (277). RAB11A geninin MDS veya AML ile ilişkisine dair bir bulguya rastlanmazken, kronik myeloid lösemide tedavi amaçlı kullanılan BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib'e dirençli gen ekspresyon imzasını ortaya çıkarmak için yapılan bir çalışmada tanımlanan genlerden biri RAB11A geni olmuştur. Genin, BCR-ABL mutasyonu taşımayan imatinib-dirençli hastalarda klinik değerlendirme için faydalı olabilecek bir belirteç olma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir (278).

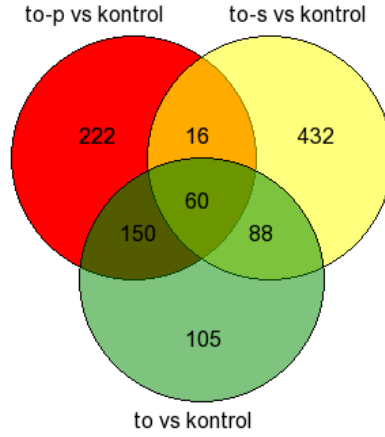
Real time sonrası yapılan analizlerde, tedavi öncesi tüm örnekler ve sonrasında **CRKL** ve **SIVA1** genlerinin bağıl ifade oranının %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği görülmüştür (CRKL, p=0.03; SIVA, p=0.001)

Bu genlerin fonksiyonlarına ilişkin bilgilere ayrıntılı bakmak genlerin öneminin daha iyi anlaşılmasında faydalı olacaktır.

SIVA1 (*apoptosis-inducing factor*) geni, apoptotik yolda (programlı hücre ölümü) önemli role sahip olan ve CD27 antijeni tarafından indüklenen önemli bir proteini kodlamaktadır. SIVA1 geni, CD27 aracılı apoptozisin indüklenmesi, Bcl-x(L) anti-apoptotik aktivitesinin inhibe edilmesi gibi fonksiyonlara sahiptir.

CRKL (*V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog-Like*) geninin RAS ve JUN kinaz sinyal yollarını aktive ettiği ve fibroblastları RAS-bağımsız hale getirdiği gösterilmiştir. Genin kodladığı protein, BCR-ABL tirozin kinaz substratıdır ve BCR-ABL tarafından gerçekleştirilen fibroblast transformasyonunda önemli rol oynamaktadır. Onkojenik potansiyele sahip CRKL geni kronik myeloid lösemi ile ilişkilidir.

Tedavi öncesi(eşli), tedavi öncesi (tek) ve tedavi öncesi (tüm) örneklerin kontrol örnekleriyle karşılaştırmalarından elde edilen farklı metilasyon gösteren kromozom bölgelerinde bulunan ve karşılaştırmalarda ortak olan genlere ilişkin sayısal veriler Şekil 6.4'te görülmektedir.



Şekil 6. 4. Tedavi öncesi örnekler ve kontrol karşılaştırmalarında ortak olan genlere ilişkin sayılar veriler

6.5. Tedavi Sonrası ve Kontrol Karşılaştırması Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tedavi sonrası örneklerin sağlıklı kontrollerle kıyaslanması ile iki grubun metilasyon profili açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu sayede tedaviden sonra ilacın etkisiyle hastalara ait metilasyon profilinin sağlıklı kontrole ne derece yaklaştığı ve ne ölçüde benzerlik gösterdiği ortaya konmaya çalışılmıştır.

Tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında **377** farklı metilasyon gösteren bölge tanımlanmıştır. Belirlenen genler üzerinden yapılan fonksiyonel anotasyon kümeleme ve zenginleşme analizinde genler 73 küme oluşturacak şekilde dağılım göstermiştir. Bu kümeler içinde apoptozis, hücre migrasyonu, gen ekspresyonunun regülasyonu, hemopoiezis gibi ontoloji terimleriyle ifade edilen önemli kümeler bulunmaktadır.

Yolak analizlerinde ise **Aktin hücre iskeleti regülasyonu** ön plana çıkmıştır. Aktin hücre iskeleti regülasyonu yolağında, WASL, APC, CFL1, FGF14, FGF5, PAK2, PDGFD ve PPP1R12A genleri bulunmaktadır. Aktin hücre iskeleti, tüm ökaryotik hücrelerde hücrenin şeklini belirleme, hücrenin hareketini sağlama gibi değişik biyolojik fonksiyonların yerine getirilmesinde görevlidir. (279).

Aktin hücre iskeleti regülasyonunda görevli **WASL** geni, Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein ailesine dahil olan bir protein kodlamaktadır. WAS proteinleri benzer domain yapısına sahiptir ve aktin iskeletin değişimi için farklı sinyal molekülleri ile ilişkilidir. WASL geni tarafından kodlanan proteinin nöral dokularda ekspresyonu yüksektir ve hücre iskeleti organizasyonuna katılan CDC42 ve aktin ilişkili protein-2/3

(ARP2/3) kompleksi gibi birçok proteinle interaksyondadır (280). WASL geninin MDS ve AML ile ilişkisine dair bir veri bulunmazken başka bir hematopoietik malignite olan Wiskott-Aldrich sendromla ilgili olduğu bilinmektedir (281).

Aktin hücre iskeleti regülasyonu yolağında yer alan diğer bir önemli gen **PAK2**, iskelet reorganizasyonu ve nükleer sinyal iletiminde rol oynayan, Rho GTPazlarla ilişkili kritik efektörlerdir. Serin/treonin kinazların bir grubu olan PAK proteinleri hücre morfolojisi, transkripsiyon ve motilite gibi değişik hücresel süreçlerde görevlidir (282). Kaspaz aracılı apoptozis sürecinde proteolitik kesimle aktive olan PAK2'nin ölüme giden hücrede morfolojik değişimlere katkıda bulunduğu düşünülmektedir (283).

Kanser hücrelerinin önemli özellikleri arasında yüksek oranda hücre proliferasyonu, hayatta kalım avantajı ve invazyon bulunmaktadır. Tüm bu süreçlerde de hücre iskeleti önemli bir role sahiptir. Hücre iskeletindeki dinamik değişimler hücre hareketi için gereklidir. Aynı şekilde kanser hücrelerinin invazyon ve metastazı da hücrenin hareketine bağlıdır. Kanser hücrelerinde hücrenin göçü ve yeniden şekillenmesi gibi özelliklerin arkasındaki sinyal yolları, Ras ilişkili küçük GTPazları ve p21 aktive kinazları içermektedir. Hücre iskeletindeki görevinin de ötesinde hayatta kalım, mitoz transkripsiyon gibi değişik hücresel aktiviteleri regüle etmeleri PAKların ne denli önemli olduklarını göstermektedir (284). Kanserlerde PAK genlerinde mutasyon görülmesi de ekspresyon seviyelerinin yüksek olması, birçok tümörde amplifikasyon ve hiperaktivite göstermeleri ve hücre transformasyonundaki rolü onları terapötik hedef haline getirmiştir (285). Çalışmamızda öne çıkan ve kanserlerde önemli olduğu bilinen genlerden biri olan PAK2 geninin MDS ve AML patogeneziyle ilişkili olduğuna dair veri bulunmamaktadır. Bu anlamda PAK2 geni MDS ve AML'deki muhtemel rolünün ortaya konulması için ileride çalışılabilecek hedef aday genlerden biri olabilir.

6.6. Real Time QRT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Promotor mikrozinleri kullanılarak gerçekleştirilen metilasyon analizleri sonucunda elde edilen verilerin biyoinformatik analiziyle her bir karşılaştırma için farklı metilasyon gösteren genler belirlenmiştir. Her bir karşılaştırmada elde edilen farklı metilasyon gösteren gen setleri üzerinden DAVID yazılımı kullanılarak fonksiyonel anotasyon kümeleme, zenginleşme ve yolak analizleri yapılmıştır. Real time PCR'da ekspresyon

seviyelerinin belirlenmesi amacıyla aşağıdaki kriterler çerçevesinde seçilen genler Çizelge 6.1’de görülmektedir.

- 3 veya daha fazla genin birlikte bulunduğu yollarda yer alması
- Genin bir veya daha fazla yollarda bulunması
- MDS-AML patogeneğinde önemli olabileceği düşünülen anotasyon kümelerinde bulunması ve bir veya daha fazla anotasyon kümesinde yer alması
- Metilasyon değişiminin yüksek olması
- Farklı karşılaştırmalardan genler bulunması

Çizelge 6. 1. Real time çalışması için seçilen genler

Genler	Karşılaştırma	Bulunduğu anotasyon kümesi/yolak
CASP4	to-ts	apoptozis regülasyonu
CFL1		
MAP3K5		
ID2	top-kontrol	eritrosit farklılaşması, transkripsiyonun negatif regülasyonu
ELK1		NGF yolağı
DNMT3A		transkripsiyonun negatif regülasyonu
RUNX1	tos-kontrol	makromolekül biyosentezi
HSPD1		mononükleer hücre proliferasyonu, apoptozis regülasyonu
SLC11A1		mononükleer hücre proliferasyonu, lökosit aracılı immünite
CHD8		apoptozis regülasyonu
ZAP70		apoptozis regülasyonu
DOCK2		mononükleer hücre proliferasyonu
CRKL		Fc-R gamma aracılı fagositoz
PRKCD		mononükleer hücre proliferasyonu, lökosit aracılı immünite
SP1	to-kontrol	hemopoiezis
SIVA1	to-kontrol	apoptozis regülasyonu
CDC42	top- kontrol, to-kontrol	patojenik E.coli enfeksiyonu, sıkı bağlantı, fokal adezyon
PAK2	top- kontrol, ts-kontrol	fokal adezyon, aktin hücre iskeleti regülasyonu, endositozis

Mikrodizin çalışmalarından elde edilen ekspresyon verisinin validasyonunda kantitatif real time PCR yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikrodizinden elde edilen veriyle real time’den elde edilen verinin korelasyon göstermemesi de çok sık karşılaşılan bir durumdur. Biyolojik ve teknik prosedürlerin değişkenlik göstermesi mikrodizin ve QPCR sonuçlarını etkilemektedir. Materyalin kalitesi, farklı verime sahip enzimlerin

kullanılması, boyalardan kaynaklanan bias'lar, işaretlenmiş örneklerin mikrozdin üzerindeki problara non-spesifik ve/veya çapraz bağlanmaları gibi sayılabilecek birçok faktör deney sonucunu etkilemektedir (286).

Çalışmamızda mikrozdin teknolojisi kullanılarak tespit edilen metilasyon değişimlerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek için gerçekleştirilen kantitatif real time PCR'da 18 genden 3'ünün karşılaştırılan gruplar arasında anlamlı ekspresyon farkı gösterdiği görülmüştür.

Mikrozdin analizi sonucunda belirlenen metilasyon değişimi seviyesinin yüksek oranda olmaması bu durumun çalışılan tüm genlerde anlamlı bir ekspresyon değişimine yol açmayabileceği ile açıklanabilir. Promotor bölge metilasyonunun gen ekspresyonunda transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını bloke etmek suretiyle etkili olduğu bilinmektedir. Bu noktada belirlenen metilasyon değişimlerinin hangi bölgeyi temsil ettiği de önemlidir. Promotor bölge haricindeki gen bölgelerindeki değişimlerin doğrudan ekspresyonu etkilememesi de diğer bir neden olarak düşünülebilir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Myelodisplastik sendrom, hem çocukluk çağında hem de yetişkinlikte önemli bir morbidite ve mortalite kaynağı olan hematolojik malignite grubundaki hastalıklardan biridir. MDS, hematopoiezinin bozulması ile ortaya çıkan, hücresel fonksiyon bozukluğu ve sitopeni ile karakterize ve akut myeloid lösemi'ye dönüşme riski yüksek olan bir hastalıktır. Bugüne dek yapılan çalışmalarla genetik ve epigenetik değişimlerin, miRNA, apoptozis, immün sistem deregülasyonu ve anjiogenezis gibi birçok etkenin hastalığın oluşumunda ve ilerlemesinde etkili olduğu gösterilmiştir. MDS patogenezi aydınlatmaya yönelik çalışmalardan, tedavide kullanılan hipometile edici ajanların etki mekanizmasını sorgulayan çalışmalara dek geniş kapsamlı araştırmalarla teşhis ve tedaviye yön verecek bilgiler elde edilmiştir. MDS tedavisinde kullanılan ve hipometile edici bir ajan olan 5-azasitidin'in genom ebadında metilasyon profili üzerine olan etkilerinin MDS ve MDS-AML hasta örnekleri kullanılarak ilk kez incelendiği bu çalışmada gerçekleştirilen metilasyon analizleri sonucunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- *MDS ve MDS-AML hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrası kemik iliği örnekleri farklı metilasyon profili göstermektedir. Tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırmasında farklı metilasyon gösteren 58 bölge tanımlanmıştır. Bu bölgelerde bulunan 20 genin hipermetile olduğu tespit edilmiştir. Tedavi sonrasında ise bu genlerin metilasyon seviyesinde azalma görülmüştür.*
- *Tedavi öncesi (eşli) örnekler ve kontrol karşılaştırmasında 452, tedavi öncesi (tek) ve kontrol karşılaştırmasında 614, tedavi öncesi tüm örnekler ve kontrol karşılaştırmasında 415, tedavi sonrası ve kontrol karşılaştırmasında ise 377 farklı metilasyon gösteren bölge tespit edilmiştir.*
- *Yalnızca tedavi öncesi olan örneklerin kontrolle karşılaştırmasından elde edilen farklı metilasyon gösteren gen sayısının tedavi sonrası bulunan örneklerden fazla olması dikkat çekmektedir. Sadece tedavi öncesi bulunan hastalarda metilasyon değişimlerinin daha fazla geni etkiliyor olması bu durumun hastalık progresyonunu etkileyebileceği fikrini güçlendirmektedir.*

- *Karşılaştırmalarda, doğal öldürücü hücre aracılı sitotoksinite, fokal adezyon, kemokin sinyal yolağı ve aktin hücre iskeleti regülasyonu ön plana çıkan yolaklardır.*
- *Metilasyon verilerinin biyoinformatik analizi sonucunda farklı metilasyon gösteren gen listeleri üzerinden gerçekleştirilen gen ontoloji, zenginleşme ve yolak analizleri ve devamında yapılan veri madenciliğı çalışmaları sonucunda belirlenen genler ve yolaklar incelediğinde gerek MDS'nin oluşum ve ilerleme sürecinde gerekse malignant transformasyonda etkili rol oynayan birçok gen tespit edilmiştir. Aynı zamanda teşhis ve tedavide yol gösterici olabilecek daha önce MDS ile ilişkilendirilmemiş ve terapötik hedef olma potansiyeli çalışılmamış genler belirlenmiştir.*
- *PIK3R1 ve TYROBP genlerine ait sonuçlar benzer literatürle birbirini doğrular nitelikte olması açısından önem taşımaktadır ve terapötik/diagnostik biyobelirteç olarak ileri analizlere alınabilecek aday genler olarak belirlenmiştir.*
- *Çalışmada sonucunda terapötik hedef ve/veya moleküler biyobelirteç olabilecek yeni genlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalara kaynak oluşturma açısından önemli bilgiler elde edilmiştir.*
- *Kantitatif real time çalışmasında tedavi öncesi tüm örnekler ve tedavi sonrası karşılaştırmasında CRKL ve SIVA1 genlerinin, tedavi öncesi ve tedavi sonrası karşılaştırmasında ise ID2 geninin bağıl ifade oranının %95 güvenle istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği görülmüştür.*

Tez çalışmasından elde edilen metilasyon verilerini desteklemek ve tamamlamak amacıyla yapılması planlanan ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenen “Myelodisplastik Sendrom (MDS) ve Akut Myeloid Lösemi’de (AML) Transkriptom Profiline Çıkarılması ile Yeni Moleküler Belirteçlerin Tanımlanması” başlıklı (Proje No: 13B330019) araştırma projesi kapsamında tedavi öncesi ve sonrası (eşli) örneklerin genom ebadında ekspresyon analizi mikrodizin teknolojisiyle gerçekleştirilmektedir. Çalışmaları devam etmekte olan bu proje ile hastalara ait

transkriptom profili çıkarılacaktır. Bunun sonucunda iki veri seti entegre edilecek ve bu sayede metilasyona bağlı epigenetik profil net olarak ortaya konacaktır.

KAYNAKLAR

1. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. Nov 22 2011;105(11):1684-1692.
2. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. Jul 1 2008;112(1):45-52.
3. Speck NA, Gilliland DG. Core-binding factors in haematopoiesis and leukaemia. *Nat Rev Cancer*. Jul 2002;2(7):502-513.
4. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. Nov-Dec 2010;2(6):640-653.
5. Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ*. Nov 2007;14(11):1851-1859.
6. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. Feb 22 2008;132(4):631-644.
7. Wikipedia [Internet]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Haematopoiesis>. Updated Last Updated Date.
8. Waun Ki Hong RCBJ, William N. Hait, Donald W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R. Weichselbaum, James F. Holland, Emil Frei III *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5th. ed; 2009.
9. Zhu J, Emerson SG. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*. May 13 2002;21(21):3295-3313.
10. Satterthwaite AB, Burn TC, Le Beau MM, Tenen DG. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics*. Apr 1992;12(4):788-794.
11. Edling CE, Hallberg B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(11):1995-1998.
12. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. Dec 15 1997;90(12):5002-5012.
13. Warr MR, Pietras EM, Passegue E. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. Nov-Dec 2011;3(6):681-701.
14. Mehta A, Hoffbrand V. *Haematology at a Glance*. 2nd Edition ed; 2009. Accessed.
15. Cilloni D, Messa F, Carturan S, et al. Myelodysplastic syndromes. *Ann N Y Acad Sci*. Dec 2004;1028:400-408.
16. Jadersten M, Hellstrom-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *J Intern Med*. Mar 2009;265(3):307-328.
17. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood*. May 15 2008;111(10):4841-4851.
18. Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leuk Res*. Feb 2003;27(2):95-120.
19. Hofmann WK, Koefler HP. Myelodysplastic syndrome. *Annu Rev Med*. 2005;56:1-16.
20. Garcia-Manero G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. Jul 2012;87(7):692-701.
21. Ma X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Am J Med*. Jul 2012;125(7 Suppl):S2-5.
22. Várkonyi J. *The Myelodysplastic Syndromes* 2011.

23. Cole P, Sateren W, Delzell E. Epidemiologic perspectives on myelodysplastic syndromes and leukemia. *Leuk Res.* Jun 1995;19(6):361-365.
24. Kouides PA, Bennett JM. Understanding the Myelodysplastic Syndromes. *Oncologist.* 1997;2(6):389-401.
25. Look AT. Molecular Pathogenesis of MDS. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:156-160.
26. Barzi A, Sekeres MA. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med.* Jan 2010;77(1):37-44.
27. Germing U, Strupp C, Kundgen A, et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* Aug 2004;89(8):905-910.
28. List AF, Vardiman J, Issa JP, DeWitte TM. Myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004:297-317.
29. Fenaux P. Myelodysplastic syndromes: From pathogenesis and prognosis to treatment. *Semin Hematol.* Apr 2004;41(2 Suppl 4):6-12.
30. [http://wiki.clinicalflow.com/cases/case_list/myelodysplastic_syndromes_\(mds\)](http://wiki.clinicalflow.com/cases/case_list/myelodysplastic_syndromes_(mds)) [Internet].
31. Valent P, Horny HP. Minimal diagnostic criteria for myelodysplastic syndromes and separation from ICUS and IDUS: update and open questions. *Eur J Clin Invest.* Jul 2009;39(7):548-553.
32. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* Aug 1976;33(4):451-458.
33. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* Jun 1982;51(2):189-199.
34. Shadduck RK, Latsko JM, Rossetti JM, Haq B, Abdulhaq H. Recent advances in myelodysplastic syndromes. *Exp Hematol.* Apr 2007;35(4 Suppl 1):137-143.
35. Bennett JM. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol.* Aug 2000;72(2):131-133.
36. Greenberg P, Anderson J, de Witte T, et al. Problematic WHO reclassification of myelodysplastic syndromes. Members of the International MDS Study Group. *J Clin Oncol.* Oct 1 2000;18(19):3447-3452.
37. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* Jul 30 2009;114(5):937-951.
38. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* Jan 2008;22(1):14-22.
39. Sanz GF, Sanz MA, Greenberg PL. Prognostic factors and scoring systems in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* Apr 1998;83(4):358-368.
40. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* Mar 15 1997;89(6):2079-2088.
41. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* Sep 20 2012;120(12):2454-2465.
42. Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* Aug 10 2007;25(23):3503-3510.
43. Wang JY, Xiao ZJ. [An update on epigenetic regulator gene mutations and pathogenesis of myelodysplastic syndromes]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* Oct 2011;19(5):1303-1309.

44. Zeidan AM, Linhares Y, Gore SD. Current therapy of myelodysplastic syndromes. *Blood Rev.* Sep 2013;27(5):243-259.
45. Will B, Zhou L, Vogler TO, et al. Stem and progenitor cells in myelodysplastic syndromes show aberrant stage-specific expansion and harbor genetic and epigenetic alterations. *Blood.* Sep 6 2012;120(10):2076-2086.
46. Agarwal A. MDS: roadblock to differentiation. *Blood.* Sep 6 2012;120(10):1968-1969.
47. Strom SS, Gu Y, Gruschkus SK, Pierce SA, Estey EH. Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia.* Nov 2005;19(11):1912-1918.
48. Du Y, Fryzek J, Sekeres MA, Taioli E. Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leuk Res.* Jan 2010;34(1):1-5.
49. Graubert T, Walter MJ. Genetics of myelodysplastic syndromes: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:543-549.
50. Qian Z, Joslin JM, Tennant TR, et al. Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia. *Chem Biol Interact.* Mar 19 2010;184(1-2):50-57.
51. Bouscary D, De Vos J, Guesnu M, et al. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* Jun 1997;11(6):839-845.
52. Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R. Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia.* Apr 1998;12(4):486-492.
53. Sawanobori M, Yamaguchi S, Hasegawa M, et al. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* Jul 2003;27(7):583-591.
54. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia.* Aug 2000;14(8):1340-1344.
55. Bogdanovic AD, Trpinac DP, Jankovic GM, Bumbasirevic VZ, Obradovic M, Colovic MD. Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment. *Leukemia.* May 1997;11(5):656-659.
56. Warlick ED, Smith BD. Myelodysplastic syndromes: review of pathophysiology and current novel treatment approaches. *Curr Cancer Drug Targets.* Sep 2007;7(6):541-558.
57. Parker JE, Mufti GJ. Ineffective haemopoiesis and apoptosis in myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* May 1998;101(2):220-230.
58. Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Mijovic A, Devereux S, Pagliuca A. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. *Blood.* Dec 1 2000;96(12):3932-3938.
59. Rajapaksa R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL. Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. *Blood.* Dec 1 1996;88(11):4275-4287.
60. Kerbauy DB, Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp Hematol.* Nov 2007;35(11):1739-1746.
61. Zang DY, Goodwin RG, Loken MR, Bryant E, Deeg HJ. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis. *Blood.* Nov 15 2001;98(10):3058-3065.

62. 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.* Jul 2002;26(7):677-686.
63. Cherian S, Bagg A. The genetics of the myelodysplastic syndromes: classical cytogenetics and recent molecular insights. *Hematology.* Feb 2006;11(1):1-13.
64. Schlegelberger B, Gohring G, Thol F, Heuser M. Update on cytogenetic and molecular changes in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* Apr 2011;53(4):525-536.
65. Mecucci C. Molecular features of primary MDS with cytogenetic changes. *Leuk Res.* Apr 1998;22(4):293-302.
66. Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Jpn J Clin Oncol.* Apr 2003;33(4):153-160.
67. Mufti GJ. Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 1992;16(1):35-41.
68. Fenaux P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* Jun 2001;73(4):429-437.
69. Raza A, Galili N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat Rev Cancer.* Dec 2012;12(12):849-859.
70. Ebert BL. Genetic deletions in AML and MDS. *Best Pract Res Clin Haematol.* Dec 2010;23(4):457-461.
71. Padron E, Komrokji R, List AF. The 5q- syndrome: biology and treatment. *Curr Treat Options Oncol.* Dec 2011;12(4):354-368.
72. Giagounidis AA, Germing U, Aul C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res.* Jan 1 2006;12(1):5-10.
73. Giagounidis AA, Germing U, Wainscoat JS, Boulwood J, Aul C. The 5q-syndrome. *Hematology.* Aug 2004;9(4):271-277.
74. Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature.* Oct 4 1974;251(5474):437-438.
75. Ebert BL. Molecular dissection of the 5q deletion in myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol.* Oct 2011;38(5):621-626.
76. Boulwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood.* Jun 15 2002;99(12):4638-4641.
77. Lai F, Godley LA, Joslin J, et al. Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics.* Jan 15 2001;71(2):235-245.
78. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, et al. Isolated del(5q) in myeloid malignancies: clinicopathologic and molecular features in 143 consecutive patients. *Am J Hematol.* May 2011;86(5):393-398.
79. Mallo M, Cervera J, Schanz J, et al. Impact of adjunct cytogenetic abnormalities for prognostic stratification in patients with myelodysplastic syndrome and deletion 5q. *Leukemia.* Jan 2011;25(1):110-120.
80. Hasle H, Niemeyer CM. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *Br J Haematol.* Jul 2011;154(2):185-195.
81. Cordoba I, Gonzalez-Porrás JR, Nomdedeu B, et al. Better prognosis for patients with del(7q) than for patients with monosomy 7 in myelodysplastic syndrome. *Cancer.* Jun 29 2011.

82. Tosi S, Scherer SW, Giudici G, Czepulkowski B, Biondi A, Kearney L. Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. *Genes Chromosomes Cancer*. Aug 1999;25(4):384-392.
83. Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer.; 2011. Updated Last Updated Date.
84. Asimakopoulou FA, White NJ, Nacheva E, Green AR. Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. Nov 1 1994;84(9):3086-3094.
85. Schmitt-Graeff AH, Muller MJ, Fisch P. Myelodysplastic syndromes. Epidemiology, molecular and morphological characteristics and risk stratification. *Pathologie*. Feb 2013;34(1):45-55.
86. Itzykson R, Kosmider O, Fenaux P. Somatic mutations and epigenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol*. Dec 2013;26(4):355-364.
87. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. Aug 2010;42(8):722-726.
88. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. Jul 2009;41(7):838-842.
89. Ades L, Boehrer S, Prebet T, et al. Efficacy and safety of lenalidomide in intermediate-2 or high-risk myelodysplastic syndromes with 5q deletion: results of a phase 2 study. *Blood*. Apr 23 2009;113(17):3947-3952.
90. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*. Mar 2009;10(3):223-232.
91. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. Feb 1 2010;28(4):562-569.
92. Montalban Bravo G, Lee E, Merchan B, Kantarjian HM, Garcia-Manero G. Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: advances in pathogenesis and disease evolution. *Br J Haematol*. Jun 5 2014.
93. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. May 28 2009;360(22):2289-2301.
94. Jankowska AM, Szpurka H, Tiu RV, et al. Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. Jun 18 2009;113(25):6403-6410.
95. Pronier E, Almire C, Mokrani H, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. Sep 1 2011;118(9):2551-2555.
96. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. Sep 2012;12(9):599-612.
97. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*. Sep 10 2009;361(11):1058-1066.
98. Thol F, Weissinger EM, Krauter J, et al. IDH1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes are associated with an unfavorable prognosis. *Haematologica*. Oct 2010;95(10):1668-1674.

99. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*. Dec 14 2010;18(6):553-567.
100. Ward PS, Patel J, Wise DR, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. Mar 16 2010;17(3):225-234.
101. Chowdhury R, Yeoh KK, Tian YM, et al. The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Rep*. May 2011;12(5):463-469.
102. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. Mar 22 2012;483(7390):474-478.
103. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. Dec 16 2010;363(25):2424-2433.
104. Thol F, Winschel C, Ludeking A, et al. Rare occurrence of DNMT3A mutations in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. Dec 2011;96(12):1870-1873.
105. Walter MJ, Ding L, Shen D, et al. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. Jul 2011;25(7):1153-1158.
106. Chen YM, Lu QY. [DNMT3A Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. Dec 2011;19(6):1556-1560.
107. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, et al. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene*. Jun 24 2010;29(25):3723-3731.
108. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet*. Apr 2011;43(4):309-315.
109. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. Jun 30 2011;364(26):2496-2506.
110. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. Aug 2010;42(8):665-667.
111. Santini V, Melnick A, Maciejewski JP, et al. Epigenetics in focus: pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit Rev Oncol Hematol*. Nov 2013;88(2):231-245.
112. Hirai H KY, Mano H, Hagiwara K, Maru Y, Omine M, Mizoguchi H, Nishida J, Takaku F. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature*. 1987;Jun 4-10;327(6121):430-2.
113. 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*. Jul 15 1993;82(2):590-599.
114. Yokota S, Kiyoi H, Nakao M, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines. *Leukemia*. Oct 1997;11(10):1605-1609.
115. Horiike S, Yokota S, Nakao M, et al. Tandem duplications of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. *Leukemia*. Sep 1997;11(9):1442-1446.
116. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. Dec 2000;21(6):167-223.
117. Fidler C, Watkins F, Bowen DT, Littlewood TJ, Wainscoat JS, Boulton J. NRAS, FLT3 and TP53 mutations in patients with myelodysplastic syndrome and a del(5q). *Haematologica*. Jul 2004;89(7):865-866.

118. Sugimoto K, Hirano N, Toyoshima H, et al. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood*. Jun 1 1993;81(11):3022-3026.
119. Bally C, Ades L, Renneville A, et al. Prognostic value of TP53 gene mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia treated with azacitidine. *Leuk Res*. Jul 2014;38(7):751-755.
120. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. Aug 2008;22(8):1539-1541.
121. Kaneko H, Misawa S, Horiike S, Nakai H, Kashima K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. *Blood*. Apr 15 1995;85(8):2189-2193.
122. Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007:392-397.
123. Jadersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*. May 20 2011;29(15):1971-1979.
124. Niimi H, Harada H, Harada Y, et al. Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*. Apr 2006;20(4):635-644.
125. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood*. Sep 1 2004;104(5):1474-1481.
126. Harada H, Harada Y, Niimi H, Kyo T, Kimura A, Inaba T. High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood*. Mar 15 2004;103(6):2316-2324.
127. Huang G, Zhang P, Hirai H, et al. PU.1 is a major downstream target of AML1 (RUNX1) in adult mouse hematopoiesis. *Nat Genet*. Jan 2008;40(1):51-60.
128. Chen CY, Lin LI, Tang JL, et al. RUNX1 gene mutation in primary myelodysplastic syndrome--the mutation can be detected early at diagnosis or acquired during disease progression and is associated with poor outcome. *Br J Haematol*. Nov 2007;139(3):405-414.
129. Dicker F, Haferlach C, Sundermann J, et al. Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia*. Aug 2010;24(8):1528-1532.
130. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. Feb 2004;4(2):143-153.
131. Wu C, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*. Aug 10 2001;293(5532):1103-1105.
132. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. May 27 2004;429(6990):457-463.
133. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*. Feb 23 2007;128(4):669-681.
134. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. Feb 23 2007;128(4):683-692.

135. Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer*. Jul 2010;10(7):457-469.
136. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. Feb 23 2007;128(4):635-638.
137. Jiang YH, Bressler J, Beaudet AL. Epigenetics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:479-510.
138. Ngalamika O, Zhang Y, Yin H, Zhao M, Gershwin ME, Lu Q. Epigenetics, autoimmunity and hematologic malignancies: a comprehensive review. *J Autoimmun*. Dec 2012;39(4):451-465.
139. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. Dec 2005;2 Suppl 1:S4-11.
140. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. Jan 1 2002;16(1):6-21.
141. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 19 2002;99(6):3740-3745.
142. Holliday R, Grigg GW. DNA methylation and mutation. *Mutat Res*. Jan 1993;285(1):61-67.
143. Lopez-Serra L, Esteller M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer*. Jun 17 2008;98(12):1881-1885.
144. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. Nov 20 2003;349(21):2042-2054.
145. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. Oct 2000;9(16):2395-2402.
146. Bestor TH. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*. Dec 25 1988;74(1):9-12.
147. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. Oct 29 1999;99(3):247-257.
148. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*. Oct 2004;61(19-20):2571-2587.
149. Razin A, Kafri T. DNA methylation from embryo to adult. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1994;48:53-81.
150. Meehan RR, Stancheva I. DNA methylation and control of gene expression in vertebrate development. *Essays Biochem*. 2001;37:59-70.
151. Chow JC, Brown CJ. Forming facultative heterochromatin: silencing of an X chromosome in mammalian females. *Cell Mol Life Sci*. Dec 2003;60(12):2586-2603.
152. Razin A, Cedar H. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell*. May 20 1994;77(4):473-476.
153. Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem*. Apr 1 2003;88(5):899-910.
154. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. Mar 13 2008;358(11):1148-1159.
155. Ji H, Ehrlich LI, Seita J, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*. Sep 16 2010;467(7313):338-342.
156. Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. Jan 23 2004;116(2):259-272.
157. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. Jan 23 2003;421(6921):448-453.

158. Leone G, D'Alo F, Zardo G, Voso MT, Nervi C. Epigenetic treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Curr Med Chem.* 2008;15(13):1274-1287.
159. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* Nov 2007;14(11):1008-1016.
160. Marmorstein R, Roth SY. Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev.* Apr 2001;11(2):155-161.
161. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* Jul 13 2001;106(1):23-34.
162. Mello CC, Conte D, Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature.* Sep 16 2004;431(7006):338-342.
163. Dogini DB, Pascoal VD, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genet Mol Biol.* Mar 2014;37(1 Suppl):285-293.
164. Erson AE, Petty EM. MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet.* Oct 2008;74(4):296-306.
165. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar 2008;9(3):219-230.
166. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* Mar 31 2000;101(1):25-33.
167. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19 2003;100(17):9779-9784.
168. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jun 2003;4(6):457-467.
169. Steensma DP. The spectrum of molecular aberrations in myelodysplastic syndromes: in the shadow of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* Jun 2007;92(6):723-727.
170. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* Sep 1 2002;100(5):1532-1542.
171. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* Sep 10 2005;23(26):6285-6295.
172. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002;3:179-198.
173. Takahashi S. Current findings for recurring mutations in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2011;4:36.
174. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996;122(3):135-140.
175. Zardo G, Tiirikainen MI, Hong C, et al. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nat Genet.* Nov 2002;32(3):453-458.
176. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* Jan 2006;7(1):21-33.
177. Crawford YG, Gauthier ML, Joubel A, et al. Histologically normal human mammary epithelia with silenced p16(INK4a) overexpress COX-2, promoting a premalignant program. *Cancer Cell.* Mar 2004;5(3):263-273.

178. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*. Jan 6 1983;301(5895):89-92.
179. Holst CR, Nuovo GJ, Esteller M, et al. Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res*. Apr 1 2003;63(7):1596-1601.
180. Warnecke PM, Bestor TH. Cytosine methylation and human cancer. *Curr Opin Oncol*. Jan 2000;12(1):68-73.
181. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol*. Dec 2004;14(6):427-432.
182. Galm O, Herman JG, Baylin SB. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev*. Jan 2006;20(1):1-13.
183. Esteller M. Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol*. Oct 2003;109(1):80-88.
184. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science*. Apr 18 2003;300(5618):455.
185. Feinberg AP. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res*. Apr 1 1999;59(7 Suppl):1743s-1746s.
186. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. Jun 2002;3(6):415-428.
187. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*. Jan 2002;196(1):1-7.
188. Choi JD, Lee JS. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform*. Dec 2013;11(4):164-173.
189. Khan H, Vale C, Bhagat T, Verma A. Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*. Jan 2013;50(1):16-37.
190. Langer F, Dingemann J, Kreipe H, Lehmann U. Up-regulation of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. Mar 2005;29(3):325-329.
191. Melki JR, Clark SJ. DNA methylation changes in leukaemia. *Semin Cancer Biol*. Oct 2002;12(5):347-357.
192. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood*. Mar 1 2001;97(5):1172-1179.
193. Hopfer O, Komor M, Koehler IS, et al. Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leuk Res*. Mar 2009;33(3):434-442.
194. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. Apr 15 1994;264(5157):436-440.
195. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. Apr 21 1994;368(6473):753-756.
196. Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, et al. Loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16; MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood*. Aug 15 1995;86(4):1548-1556.
197. Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB. Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res*. Feb 15 1996;56(4):722-727.

198. Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*. Apr 15 1998;91(8):2985-2990.
199. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*. Aug 15 1997;90(4):1403-1409.
200. Lubbert M. Gene silencing of the p15/INK4B cell-cycle inhibitor by hypermethylation: an early or later epigenetic alteration in myelodysplastic syndromes? *Leukemia*. Sep 2003;17(9):1762-1764.
201. Tien HF, Tang JH, Tsay W, et al. Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol*. Jan 2001;112(1):148-154.
202. Chim CS, Liang R, Tam CY, Kwong YL. Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance. *J Clin Oncol*. Apr 1 2001;19(7):2033-2040.
203. Wong IH, Ng MH, Huang DP, Lee JC. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood*. Mar 15 2000;95(6):1942-1949.
204. Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Sep 2003;17(9):1813-1819.
205. Hopfer O, Nolte F, Mossner M, et al. Epigenetic dysregulation of GATA1 is involved in myelodysplastic syndromes dyserythropoiesis. *Eur J Haematol*. Feb 2012;88(2):144-153.
206. Zhou L, Opalinska J, Sohal D, et al. Aberrant epigenetic and genetic marks are seen in myelodysplastic leukocytes and reveal Dock4 as a candidate pathogenic gene on chromosome 7q. *J Biol Chem*. Jul 15 2011;286(28):25211-25223.
207. Issa JP, Zehnbaauer BA, Civin CI, et al. The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*. Mar 1 1996;56(5):973-977.
208. Li Q, Kopecky KJ, Mohan A, et al. Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. May 1999;5(5):1077-1084.
209. Corn PG, Smith BD, Ruckdeschel ES, Douglas D, Baylin SB, Herman JG. E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia. *Clin Cancer Res*. Nov 2000;6(11):4243-4248.
210. Melki JR, Vincent PC, Brown RD, Clark SJ. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*. May 15 2000;95(10):3208-3213.
211. Johan MF, Bowen DT, Frew ME, Goodeve AC, Reilly JT. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. Apr 2005;129(1):60-65.
212. Ihalainen J, Pakkala S, Savolainen ER, Jansson SE, Palotie A. Hypermethylation of the calcitonin gene in the myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. Feb 1993;7(2):263-267.
213. Issa JP, Zehnbaauer BA, Kaufmann SH, Biel MA, Baylin SB. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res*. May 1 1997;57(9):1678-1681.

214. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Cancer-specific region of hypermethylation identified within the HIC1 putative tumour suppressor gene in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. Jun 1999;13(6):877-883.
215. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. Aug 1 1999;59(15):3730-3740.
216. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*. May 1 2001;97(9):2823-2829.
217. Lyons RM. Myelodysplastic syndromes: therapy and outlook. *Am J Med*. Jul 2012;125(7 Suppl):S18-23.
218. Atallah E, Garcia-Manero G. Treatment strategies in myelodysplastic syndromes. *Cancer Invest*. Mar 2008;26(2):208-216.
219. List A, Dewald G, Bennett J, et al. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. *N Engl J Med*. Oct 5 2006;355(14):1456-1465.
220. List A, Kurtin S, Roe DJ, et al. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. Feb 10 2005;352(6):549-557.
221. Kuendgen A, Lubbert M. Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*. Aug 2008;87(8):601-611.
222. Kaminskas E, Farrell AT, Wang YC, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: azacitidine (5-azacytidine, Vidaza) for injectable suspension. *Oncologist*. Mar 2005;10(3):176-182.
223. Griffiths EA, Gore SD. Epigenetic therapies in MDS and AML. *Adv Exp Med Biol*. 2013;754:253-283.
224. Kornblith AB, Herndon JE, 2nd, Silverman LR, et al. Impact of azacitidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. May 15 2002;20(10):2441-2452.
225. 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*. May 15 2002;20(10):2429-2440.
226. Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol*. Jun 2005;35(6):293-301.
227. Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res*. 1998;72:141-196.
228. Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. *Haematologica*. Dec 2002;87(12):1324-1341.
229. Silverman LR. Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS). *Oncologist*. 2001;6 Suppl 5:8-14.
230. Steensma DP, Baer MR, Slack JL, et al. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial. *J Clin Oncol*. Aug 10 2009;27(23):3842-3848.
231. Voso MT, Santini V, Finelli C, et al. Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*. Aug 1 2009;15(15):5002-5007.
232. Mano H. DNA micro-array analysis of myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. Jan 2006;47(1):9-14.
233. Pellagatti A, Fidler C, Wainscoat JS, Boultonwood J. Gene expression profiling in the myelodysplastic syndromes. *Hematology*. Aug 2005;10(4):281-287.

234. Schmelz K, Sattler N, Wagner M, Lubbert M, Dorken B, Tamm I. Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia*. Jan 2005;19(1):103-111.
235. Mund C, Hackanson B, Stresemann C, Lubbert M, Lyko F. Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res*. Aug 15 2005;65(16):7086-7090.
236. Desmond JC, Raynaud S, Tung E, Hofmann WK, Haferlach T, Koeffler HP. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia*. May 2007;21(5):1026-1034.
237. Soriano AO, Yang H, Faderl S, et al. Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*. Oct 1 2007;110(7):2302-2308.
238. Serrano E, Carnicer MJ, Laso A, et al. Epigenetic-based treatments emphasize the biologic differences of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Leuk Res*. Jun 2008;32(6):944-953.
239. Fabiani E, Leone G, Giachelia M, et al. Analysis of genome-wide methylation and gene expression induced by 5-aza-2'-deoxycytidine identifies BCL2L10 as a frequent methylation target in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. Dec;51(12):2275-2284.
240. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. Feb 5 2009;113(6):1315-1325.
241. Yan P, Frankhouser D, Murphy M, et al. Genome-wide methylation profiling in decitabine-treated patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. Sep 20 2012;120(12):2466-2474.
242. del Rey M, O'Hagan K, Dellett M, et al. Genome-wide profiling of methylation identifies novel targets with aberrant hypermethylation and reduced expression in low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. Mar 2012;27(3):610-618.
243. <http://www.rithme.eu/?m=home&p=kdprocess&lang=en> [Internet].
244. NimbleGen. <http://www.nimblegen.com/> [Internet].
245. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.
246. Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. Nov 5 2009;361(19):1872-1885.
247. McDevitt MA. Clinical applications of epigenetic markers and epigenetic profiling in myeloid malignancies. *Semin Oncol*. Feb 2012;39(1):109-122.
248. Öztürk ÖG. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genes. *Archives Medical Review Journal*. 2011; 20 (3), 131-144.
249. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*. 2003;90:127-156.
250. Pellagatti A, Cazzola M, Giagounidis A, et al. Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells. *Leukemia*. Apr 2010;24(4):756-764.
251. Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:615-675.
252. Chiu YH, Lee JY, Cantley LC. BRD7, a tumor suppressor, interacts with p85alpha and regulates PI3K activity. *Mol Cell*. Apr 10 2014;54(1):193-202.

253. Tang JF, Wen Q, Sun J, Zhang WM, Zhu HL. Advances in the Researches on the Biological Activities and Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-kinase. *Anticancer Agents Med Chem.* Jun 2014;14(5):673-687.
254. KEGG PATHWAY Database [Internet]. <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Updated Last Updated Date.
255. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* Jul 2002;2(7):489-501.
256. Jimenez C, Jones DR, Rodriguez-Viciano P, et al. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* Feb 2 1998;17(3):743-753.
257. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* Oct 15 2001;61(20):7426-7429.
258. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, et al. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* Jan 1999;21(1):99-102.
259. Sun M, Paciga JE, Feldman RI, et al. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res.* Aug 15 2001;61(16):5985-5991.
260. Kamura T, Hara T, Matsumoto M, et al. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol.* Dec 2004;6(12):1229-1235.
261. Lin YW, Aplan PD. Gene expression profiling of precursor T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma identifies oncogenic pathways that are potential therapeutic targets. *Leukemia.* Jun 2007;21(6):1276-1284.
262. Li X, Ying SX, Liu YZ, et al. Relationship between macrophages and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* Jun 2003;32(3):226-229.
263. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol.* Dec 2010;120(6):707-718.
264. Aumann S, Abdel-Wahab O. Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 9 2014.
265. Eke I, Cordes N. Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. *Semin Cancer Biol.* Aug 10 2014.
266. Kasza A. Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. *Biochim Biophys Acta.* Oct 2013;1829(10):1026-1033.
267. Odrowaz Z, Sharrocks AD. ELK1 uses different DNA binding modes to regulate functionally distinct classes of target genes. *PLoS Genet.* 2012;8(5):e1002694.
268. Odrowaz Z, Sharrocks AD. The ETS transcription factors ELK1 and GABPA regulate different gene networks to control MCF10A breast epithelial cell migration. *PLoS One.* 2012;7(12):e49892.
269. Shao XJ, Miao MH, Chen ZX, Qi XF, Shen HJ. Significance of interplay between Rap1 and cadherin to the development of myelodysplastic syndrome. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* Jul 2012;33(7):522-526.
270. Stengel K, Zheng Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal.* Sep 2011;23(9):1415-1423.

271. Chen G, Zeng W, Miyazato A, et al. Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities. *Blood*. Dec 15 2004;104(13):4210-4218.
272. Laviola L, Natalicchio A, Giorgino F. The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des*. 2007;13(7):663-669.
273. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. Aug 1 1997;90(3):909-928.
274. Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol*. Jul 2005;20(3):907-926.
275. Sille FC, Thomas R, Smith MT, Conde L, Skibola CF. Post-GWAS functional characterization of susceptibility variants for chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2012;7(1):e29632.
276. Cocco L, Manzoli L, Palka G, Martelli AM. Nuclear phospholipase C beta1, regulation of the cell cycle and progression of acute myeloid leukemia. *Adv Enzyme Regul*. 2005;45:126-135.
277. Gebhardt C, Breitenbach U, Richter KH, et al. c-Fos-dependent induction of the small ras-related GTPase Rab11a in skin carcinogenesis. *Am J Pathol*. Jul 2005;167(1):243-253.
278. Chung YJ, Kim TM, Kim DW, et al. Gene expression signatures associated with the resistance to imatinib. *Leukemia*. Sep 2006;20(9):1542-1550.
279. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. Jan 23 1998;279(5350):509-514.
280. Thrasher AJ. WASp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol*. Sep 2002;2(9):635-646.
281. Snapper SB, Rosen FS. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:905-929.
282. Jaffer ZM, Chernoff J. p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol*. Jul 2002;34(7):713-717.
283. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science*. Jun 6 1997;276(5318):1571-1574.
284. Dummler B, Ohshiro K, Kumar R, Field J. Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. Jun 2009;28(1-2):51-63.
285. Ye DZ, Field J. PAK signaling in cancer. *Cell Logist*. Apr 1 2012;2(2):105-116.
286. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. 2006;8:175-193.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hülya Sümer Çelebi

Doğum Yeri: ANKARA

Doğum Tarihi: 02.07.1983

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Ankara Kurtuluş Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi. Fen Fakültesi. Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi. Biyoteknoloji Enstitüsü. Temel Biyoteknoloji

Yayınlar

SCI'da Yer Alan Makaleler:

Hülya Sümer Çelebi, Hilal Özdağ, Comparison of High-resolution melting analysis (HRM) to Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) in the detection of point mutations in *MEFV*, F5 and F2 genes. Turk J Med Sci 2014; 44(5): 713-719.

Ulusal Kongrelerde ve Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildiriler:

Hülya Sümer Çelebi, Zeynep Özkeserli, Nevin Belder, Farid Rajabli, Gülşah Kaygusuz, Günhan Gürman, Gökhan İlk, Muhit Özcan, Sinem Civriz, Fevzi Altuntaş, Murat Albayrak, Harika Çelebi, Pervin Topçuoğlu, Osman İlhan, Mehmet Ertem, Hilal Özdağ, Işinsu Kuzu. Myelodisplastik Sendrom (MDS) ve Akut Myeloid Lösemi (AML)'de Genom Boyu Metilasyon Profilinin Belirlenmesi (Poster) XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Aydın, 2013.

Hülya Sümer Celebi, Gülşah Kaygusuz, Günhan Gürman, Gökhan İlk, Pervin Topçuoğlu, Muhit Özcan, Osman İlhan, Hilal Özdağ, Işinsu Kuzu. 5-Azasitidin Tedavisi Uygulanan MDS ve AML Hastalarında Genom Boyu Metilasyon Profili: Ön Çalışma Bulguları (Sözlü Bildiri) 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, 2012.

Hülya Sümer Celebi, Gülşah Kaygusuz, Günhan Gürman, Gökhan İlk, Pervin Topçuoğlu, Muhit Özcan, Osman İlhan, Hilal Özdağ, Işinsu Kuzu. Genome-wide methylation profiling with 5-azacitidine treatment in MDS and AML patients-“preliminary results” (Sözlü Bildiri) EuGESMA-7th Work Group & 9th Management Committee Meeting, İstanbul, 2012.

Hülya Sümer, Hilal Özdağ. Nokta Mutasyonlarının Saptanmasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi (**Poster**) 12.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya, 2011.

Nevin Belder, Dilay Çıglıdağ Düngül, Farid Rajebli, **Hülya Sümer**, Ayhan Kuzu, Berna Savaş, Arzu Ensari, H. Gökhan İlk, Özlem İlk, Hilal Özdağ. Sporadik Kolorektal Kansere Vakalarında Genom ve Transkriptom Boyu Analizlerle Yeni Genetik Yatkınlık Genlerinin ve Kanserin Gelişmesinde Etkin Olan Genlerin Belirlenmesi 6. Cerrahi Araştırma Kongresi, Ankara, 2011.

Comparison of high-resolution melting analysis to denaturing high performance liquid chromatography in the detection of point mutations in *MEFV*, *F5*, and *F2* genes

Hülya SÖMER ÇELEBİ, Hilal ÖZDAĞ*

Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

Received: 12.04.2013 • Accepted: 09.08.2013 • Published Online: 15.08.2014 • Printed: 12.09.2014

Background/aim: Sensitive and cost-effective detection of point mutations is important in genetics research. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) is known to be one of the most sensitive techniques for point mutation detection. A more recent technique, high-resolution melting (HRM), is based on the melting behavior of PCR products. In this study, the efficiency and sensitivity of HRM and DHPLC for the detection of *MEFV*, *F5*, and *F2* gene point mutations were evaluated.

Materials and methods: We studied 15 patients with *MEFV* mutations (E148Q, M680I, M694V, or V726A), 7 patients with the P51691G>A mutation, and 12 patients with the P220210G>A mutation. All mutations were screened by HRM and DHPLC.

Results: All mutations were successfully detected by HRM. However, only 4 (*MEFV* E148Q and M680I, P51691G>A, and P220210G>A) of 6 mutations were successfully detected with DHPLC.

Conclusion: Our study showed that HRM is more sensitive than DHPLC for detection of the studied point mutations.

Key words: Point mutations, high-resolution melting analysis, denaturing high-performance liquid chromatography

1. Introduction

A fast, accurate, and cost-effective mutation screening technique is important, especially for clinical settings. Familial Mediterranean fever (FMF) is an autoinflammatory and autosomal recessive disorder that is common in the eastern Mediterranean region and particularly affects people of Armenian, Turkish, Arab, and non-Ashkenazi Jewish ancestry (1,2). The prevalence of the disease is 1/1000 in Turkey (3). FMF is characterized by recurrent fever attacks and is often caused by mutations in the *MEFV* gene, which encodes a protein called pyrin (4). To date, around 30 mutations associated with FMF have been reported. Out of these mutations, E148Q, M680I, M694V, and V726A are the most common mutations routinely screened for FMF diagnosis (5-7).

Meanwhile, thrombophilia is a multifactorial disease with significant morbidity and mortality (8,9). Factor V Leiden, a mutation in the *F5* gene at position 1691, and factor II G20210A, a mutation in the 3' untranslated region of the prothrombin gene at position 20210, are the most common and routinely screened mutations in hereditary thrombophilia (10-12).

A sensitive, accurate, and cost-effective mutation screening method is indispensable for routine diagnostic

screening. There are several different methods for the analysis of DNA sequence variations, such as single-strand conformation polymorphism (SSCP) (13), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (14), denaturing gradient gel electrophoresis (DGCE) (15), temperature gradient capillary electrophoresis (16), denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) (17), and DNA sequencing. The sensitivity and specificity of these methods vary.

DHPLC is one of the most reliable techniques in the detection of point mutations. In the presence of heterozygote mutations, it detects changes in the melting profile of amplified DNA fragment (18). Certainly, DNA sequencing is widely accepted as the golden standard in mutation detection. However, these 2 techniques are expensive and time-consuming.

In 2002, high-resolution melting (HRM) was introduced to mutation analysis research. Many applications of HRM analysis have been described, including methylation, small amplicon genotyping, mutation scanning, and unlabeled probe genotyping. This method is based on the characterization of DNA sequence variations through the analysis of the melting profile of a DNA sample (19). The thermal stability and melting behavior of a PCR product

* Correspondence: hilalozdag@gmail.com