

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANA BİLİM DALI



MİR-182, MİR-320A, MİR-144'ÜN EBV-POZİTİF BURKITT LENFOMA İLE OLAN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Mevsim SAYDAM

Danışman

Doç. Dr. Sercan ERGÜN

2. Danışman

Prof. Dr. Ayhan DAĞDEMİR

Bu çalışma, TÜBİTAK 1002A Hızlı Destek Modülü tarafından 222S131 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☒

Hayır ☐

05 /06 / 2023
Mevsim SAYDAM

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : MİR-182, MİR-320A, MİR-144'ÜN EBV POZİTİF BURKITT LENFOMA İLE OLAN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05.06.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 9

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

05 /06/ 2023
Doç. Dr. Sercan ERGÜN

ÖZET

MİR-182, MİR-320A, MİR-144'ÜN EBV POZİTİF BURKITT LENFOMA İLE OLAN İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mevsim SAYDAM

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Haziran/2023

Danışman: Doç. Dr. Sercan ERGÜN

2. Danışman: Prof. Dr. Ayhan DAĞDEMİR

Burkitt Lenfoma (BL) ve Epstein Barr Virüsü (EBV) arasında bariz fakat belirsiz bir ilişki vardır. Yapılan çalışmalar sonucunda EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücrelerinde mikroRNA'ların (miRNA'ların) rolü gösterilmiştir. İn-siliko çalışmalar ve literatür taraması ile lenfoma ile ilişkili ve B lenfosit oluşum yolağında rol alabilecek miRNA'ların belirlenmesi hedeflendi. EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücrelerinde daha önce bu yönüyle araştırılmamış miRNA'ların ifade analizi ve karşılaştırması ile EBV'nin BL'deki rolüne dair bilgi edinmek amaçlanmaktadır.

İn-siliko analizler sonucunda B lenfosit oluşum yolağında regülatör olarak görev alan *BLIMP1* ve *XBP1* genlerini hedefleyen ve lenfoma ile ilişkilendirilmiş üç miRNA (miR-182, miR-320a, miR-144) belirlendi. BL tanısı alan 28 hastanın parafine gömülü doku örneği çalışmaya dahil edildi. BamH1-W bölgesine ve ApoB'ye spesifik yapılan RT-PCR sonuçlarına göre örnekler 14 EBV-pozitif ve 14 EBV- negatif olarak iki ayrı gruba ayrıldı. Seçilen üç miRNA'nın RT-PCR ile ekspresyon analizi yapıldı ve iki ayrı grup arasında ekspresyon farklarının anlamlılık analizleri gerçekleştirildi. Klinik veri ile miRNA ekspresyonu arasında ilişki kurulmaya çalışıldı. BamH1-W/ApoB oranına göre EBV-pozitif ve EBV-negatif BL olarak iki gruba ayrılan örneklerde gerçekleştirilen miRNA qPCR sonuçlarına göre, miR-182 ve miR-144 ekspresyonu gözlenmedi. Bu nedenle bu iki miRNA istatistik analize tabi tutulmadı. MiR-320a ifadesi ise her örnekte gözlemlendi ve EBV-pozitif BL örneklerinde miR-320a ifadesi ile bir korelasyon gözlenmedi ($p>0.05$). EBV-negatif grup ile miR-320a ekspresyon ifadesi arasında ise pozitif bir korelasyon bulundu ($p<0.05$).

MiRNA'lar EBV ve lenfoma arasındaki ilişkide potansiyel düzenleyicilerdir. Aynı zamanda EBV enfekte BL hücrelerinde tümörögenizde rol oynuyor olabilirler. Çalışmamız yapılacak olan çalışmalar için fikir oluşturabilir. EBV ve BL ilişkisi ilerleyen zamanlarda netlik kazanabilir. EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücrelerinde farklı seviyede eksprese olan miRNA'lar tanı ve tedavide umut potansiyele sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Burkitt lenfoma, Epstein-Barr, miRNA, ekspresyon

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF MIR-182, MIR-320A, MIR-144 WITH EBV-POSITIVE BURKITT LYMPHOMA

Mevsim SAYDAM

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Medicine

Master, June/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sercan ERGÜN

2. Supervisor: Prof. Dr. Ayhan DAĞDEMİR

There is a clear but uncertain relationship between Burkitt Lymphoma (BL) and Epstein-Barr Virus (EBV). Previous studies have demonstrated the role of microRNAs (miRNAs) in EBV-positive and EBV-negative BL cells. This study aimed to identify miRNAs associated with lymphoma and involved in the B lymphocyte differentiation pathway through in-silico analysis and literature review. The objective was to gain insights into the role of EBV in BL through expression analysis and comparison of miRNAs that have not been previously investigated in EBV-positive and EBV-negative BL cells.

In-silico analysis identified three miRNAs (miR-182, miR-320a, miR-144) targeting *BLIMP1* and *XBP1* genes, which play regulatory roles in the B lymphocyte differentiation pathway and have been associated with lymphoma. Paraffin-embedded tissue samples from 28 patients diagnosed with BL were included in the study. Based on the results of BamH1-W region and ApoB-specific qPCR analysis, the samples were divided into two separate groups: 14 EBV-positive and 14 EBV-negative. QPCR expression analysis of selected three miRNAs was performed, and expression differences between two groups were statistically analyzed. Analysis was realized to establish a correlation between clinical data and miRNA expression. Based on the RT-PCR results of miRNAs in the samples divided into EBV-positive and EBV-negative groups according to BamH1-W/ApoB ratio, no expression of miR-182 and miR-144 was observed. Therefore, these two miRNAs were not subjected to statistical analysis. Expression of miR-320a was observed in all samples, and no correlation was found between miR-320a expression and EBV-positive BL samples ($p>0.05$). However, a positive correlation was found between miR-320a expression and the EBV-negative group ($p<0.05$).

MiRNAs are potential regulators in the association between EBV and lymphoma. They may also play a role in tumorigenesis in EBV-infected BL cells. Our study can create ideas for the work to be done. The association between EBV and BL may become clear in the future. Differentially expressed miRNAs in EBV-positive and EBV-negative BL cells are promising in diagnosis and treatment.

Keywords: Burkitt Lymphoma, Epstein-Barr Virus, miRNA, expression

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başından beri bana her konuda yol gösteren, desteğini esirgemeyen ve sabırla yardımcı olan danışmanım sayın Doç. Dr. Sercan ERGÜN'e teşekkür ediyorum.

Akademik birikimlerini her süreçte bizimle paylaşan, desteğini hep hissettiğim OMÜ Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e teşekkür ediyorum.

Tezimin temellerini beraber attığımız ve bu süreçte desteğini esirgemeyen Sayın Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ayhan DAĞDEMİR'e ve Hematoloji-Onkoloji alanında tüm birikimlerini benimle paylaşan, beraber fikir alışverişi yaparak fikrin gelişmesini sağlayan Sayın Uzm. Dr. Oğuz Salih DİNÇER'e teşekkür ediyorum.

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nde düşüncelerime ve akademik hayatıma yön veren tüm akademisyenlere teşekkür ediyorum.

Her koşulda yanımda olan ve desteğini hep hissettiğim, omzumdaki el olan annem Zahide KALEM'e ve biricik kardeşim İklim'e teşekkür ediyorum.

Tezimin gerçekleşmesinde 222S131 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Mevsim SAYDAM

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Burkitt Lenfoma Tanım ve Tarihçesi.....	3
2.1.1. Burkitt Lenfoma Sınıflandırması	4
2.1.2. Epidemiyolojisi.....	5
2.1.3. Etiyopatogenezi ve Moleküler Biyolojisi.....	6
2.1.4. Morfoloji ve İmmünohistokimyasal Özellikleri	8
2.1.5. Klinik Özellikleri ve Tanısı	9
2.2. Epstein-Barr Virüsünün Keşfi ve Epidemiyolojisi	10
2.2.1. EBV'nin Genel Özellikleri	11
2.2.2. EBV'nin Yaşam Döngüsü ve B Hücre Enfeksiyonu	13
2.2.3. Burkitt Lenfoma Patogenezi EBV	16
2.3. MiRNA Tarihçesi ve Biyogenezi	19
2.3.1. MiRNA Fonksiyonu ve Kanserdeki Rolü	21
2.3.2. EBV Pozitif Burkitt Lenfomada MiRNA'nın Rolü	23
2.3.3. Çalışmaya Dahil Edilen MiRNA'lar	24
2.3.3.1. MiR-182-5p	25
2.3.3.2. MiR-320a.....	25
2.3.3.3. MiR-144-5p	26
3. MATERYAL-METOD.....	27
3.1. Çalışma Grubu	27
3.2. Materyal.....	27
3.3. Ön Çalışma: İn Siliko miRNA analizi	28
3.4. FFPE Doku Örneklerinden RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	29
3.5. cDNA Çevrimi	31
3.6. Real-Time PCR ile EBV Tespiti	32
3.7. Real-Time PCR ile MiRNA Ekspresyon Analizi	34
3.8. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Hasta verileri	38
4.2. EBV Kopya Sayısı Tespiti ve EBV Pozitif-Negatif Ayrımı	39
4.3. MiRNA İfade Değişimleri	41
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ	52
KAYNAKÇA.....	54
EKLER.....	63
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

AGO	: Argonoute
BCL-2	: B Cell Lymphoma-2
BCL-6	: B Cell Lymphoma-6
BCL6B	: B-hücresi CLL/lenfoma 6 üyeli B proteini,
BCR	: B Hücre Antijen Reseptörü
BHRFI	: Bam HI Fragment H Rightward Open Reading Frame 1
BL	: Burkitt Lenfoma
BLIMP1	: B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1
BNIP3	: Bcl-2 interacting protein 3
CCND3	: Siklin D3
CD	: Cluster Of Differentiation
cDNA	: Koplementer DNA
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
CTL	: Sitotoksik T Lenfositleri
DLBCL	: yaygın büyük B hücreli lenfoma
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ds	: Double Strand
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EBER	: Epstein-Barr Virus-Encoded Small Rnas
EBNA-1	: Epstein-Barr Nükleer Antijen 1
EBNA-LP	: Epstein Barr Virüs Nuclear Antigen Leader Protein
EBV	: Epstein-Barr Virus
EMT	: epithelial-mesenchymal transition
GC	: Germinal Merkez
Gp	: Gliko Protein
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
ID3	: Inhibitor Of DNA Binding 3
IL-10	: Interlökin 10
IM	: Enfeksiyöz mononükleaz
Kb	: Kilobaz
LMP1	: Latent Membrane Protein 1

MAP3K9	: Mitojenle aktive olan protein kinaz kinaz kinaz 9,
MAPK1	: Mitogen Activated Protein Kinase 1
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MiRISC	: RNA-İnduced Silencing Kompleks
MiRNA	: Micro RNA
MLF1	: Miyeloid lösemi faktörü 1
mRNA	: Mesajcı RNA
MYC	: Master Regulator Of Cell Cycle Entry And Proliferative Metabolism
NHL	: Non hodgkin lenfoma
ORF	: Open Reading Frame
PI3K	: Fosfoinositid 3--Kinaz
Pre-Mirna	: Precursur Mirna
Pri-Mirna	: Primer Mirna
PTEN	: Phosphatase And Tensin Homolog
RAB14	: Ras ile ilgili protein Rab-14
RNA	: Ribonükleik Asit
RT-PCR	: Real Time PCR
SHM	: Somatik Hiper Mutasyon
Ss	: Single Strand
TCF3	: Transkripsiyon Faktör 3
TR	: Tandem Repeat
TRIAP1	: TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1
TUSC3	: Tümör baskılayıcı aday 3
UTR	: Untransleted Region
XBP1	: X Box Binding Protein 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. BL'nin anlaşılmasında kilometre taşları.....	4
Şekil 2.2. BL'de somatik mutasyonlar.....	7
Şekil 2.3. BL patogenezi	8
Şekil 2.4. EBV yapısı	12
Şekil 2.5. EBV gizli genlerinin çift sarmallı viral DNA epizomu üzerindeki konumu ve transkripsiyonu	13
Şekil 2.6. EBV in-vivo kalıcılığı.....	15
Şekil 2.7. B hücresinde EBV yaşam döngüsünün iki modeli	16
Şekil 2.8. EBV ve BL arasındaki ilişkiye dair senaryo	18
Şekil 2.9. MiRNA Biyogenezi.....	20
Şekil 3.1 Çalışmanın akış şeması.....	29
Şekil 3.2. MiR-144-5p'nin <i>BLIMP1</i> üzerindeki bağlanma hedef bölgesi	30
Şekil 3.3. miR-320a'nın <i>BLIMP1</i> hedefi için bağlanma bölgesi	30
Şekil 3.4. MiR-182-5p'nin <i>XBP1</i> hedefi için bağlanma bölgesi.....	30
Şekil 3.5. Non-spesifik ürün çoğalmasını gösteren Real-Time PCR grafiği	36
Şekil 4.1. Tüm örneklerde EBV kopya sayısı grafiği.....	39
Şekil 4.2. EBV-pozitif örneklerde EBV kopya sayı grafiği	40
Şekil 4.3. EBV-negatif örneklerde EBV kopya sayı değişim grafiği.	40
Şekil 4.4 MiR-182 Real- Time PCR sonucu alınan cycle grafiği	42
Şekil 4.5. 28 örnekte(EBV-pozitif ve EBV-negatif)miR-320a ifade değişim grafiği	42
Şekil 4.6. EBV-pozitif örneklerde miR-320a ekspresyon grafiği	43
Şekil 4.7. EBV-negatif örneklerde miR-320a ekspresyon grafiği	43
Şekil 4.8. EBV-negatif örneklerde miR-320a ifade değişim grafiği.....	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. BL alt tipleri arasında karşılaştırma.....	4
Tablo 2.2. EBV hedef hücreleri ve ilişkili olduğu bazı tümörler veya bozukluklar.....	11
Tablo 2.3. BL’de EBV protein ifade modeli	18
Tablo 3.1. cDNA PCR Reaksiyonu	32
Tablo 3.2. cDNA çevrim PCR koşulları.....	33
Tablo 3.3. RT-PCR Reaksiyonu	34
Tablo 3.4. RT-PCR koşulları	34
Tablo 3.5. RT-PCR reaksiyon.....	35
Tablo 3.1. RT- PCR koşulları	36
Tablo 4.1. Demagrofik bilgiler	37
Tablo 4.2. İmmünohistokimya analiz verileri.....	37
Tablo 4.3. Kantitatif PCR sonuçları.....	39
Tablo 4.4. 28 BL örneğinde miR-320a ifade korelasyon analizi	43
Tablo 4.5. EBV-pozitif grup ile miR-320a korelasyon analizi	44
Tablo 4.6. EBV-negatif grup ile miR-320a ifade korelasyon analizi.....	44

1. GİRİŞ

Burkitt Lenfoma (BL), *MYC* translokasyonu ile karakterize agresif B hücreli Non-Hodgkin lenfomadır. Bir translokasyonla ilişkilendirilen ilk tümör olma özelliği taşır. Sıtma, HIV, EBV gibi kofaktörler BL patogeneğinde rol oynamaktadır (Molyneux, Rochford et al. 2012). Bu nedenle BL tümörögenezi merak edilen bir konudur. BL, farklı patojenlere maruz kalma, germline yatkınlığı gibi birçok faktör tarafından modüle edilir (López, Burkhardt et al. 2022). Bu faktörlere maruz kalma farklı popülasyonlarda farklı sebeplere neden olur. Bu nedenle BL, sporadik, endemik ve immün yetersizlikle ilişkili BL olmak üzere üç alt sınıfta incelenir. Fakat tüm alt tiplerinde *MYC* translokasyonu ortak bir etkidir (Dunleavy, Little et al. 2016). Özellikle EBV ile yakından ilişkili olan BL patogeneğinde hala aydınlanmamış noktalar vardır. Birçok gen mutasyonu, onkogen ekspresyonu ve kofaktörler tarafından modüle edilen BL patogenezi oldukça karmaşıktır (Campo 2012). Bu nedenle, tedavi yaklaşımları geliştirilmek durumundadır.

EBV, BL hücrelerinde tespit edilen ve tümörle ilişkilendirilen ilk virüs olma özelliği taşır (Epstein 1964). B lenfositleri ve epitel hücreleri hedefleyen EBV aslında insanların %90'ından fazlasını enfekte etmiştir. Asemptomik olan EBV enfeksiyonu bazı durumlarda litik faza geçer ve bu durumlarda tümör ya da başka hastalıklarla sonuçlanır (Macswen and Crawford 2003). Endemik BL'nin %95'i EBV pozitifdir. Sporadik ve immün yetmezlikle ilişkili BL'de oran düşüktür fakat yine de EBV pozitif vakalar mevcuttur (Magrath 2012). Bu nedenle EBV ve BL ilişkisi, EBV'nin BL patogeneğine katkısı merak edilmiş ve çalışmalar yapılmıştır. EBV'nin B lenfositleri bölünmesini indüklemeye ve dönüştürme özelliği olduğu bilinmektedir (Saha and Robertson 2011) Ayrıca *MYC* aktivasyonunu ve translokasyonunu indüklediği de bilinmektedir (Allday 2009). Lenfoma gelişim yolağında genetik değişiklikler oluşturan EBV, B lenfositlerinden transformasyon ilişkili viral genleri eksprese eder (Rowe, Fitzsimmons et al. 2014). Yapılan çalışmalar sonucunda EBV'nin apoptoza direnç, somatik hiper-mutasyon birikimi, B hücre proliferasyonunu indüklemeye yolları ile BL patogeneğinde rol aldığı bilinmektedir (Van den Bosch 2012).

Son zamanlarda yapılan çalışmaların sonucu bu süreçte miRNA'larında rol oynadığı yönündedir. MiRNA'lar 19-25 nükleotid uzunluğunda gen ifadesinin düzenlenmesinden sorumlu post-transkripsiyonel elemanlardır (Lu and Rothenberg

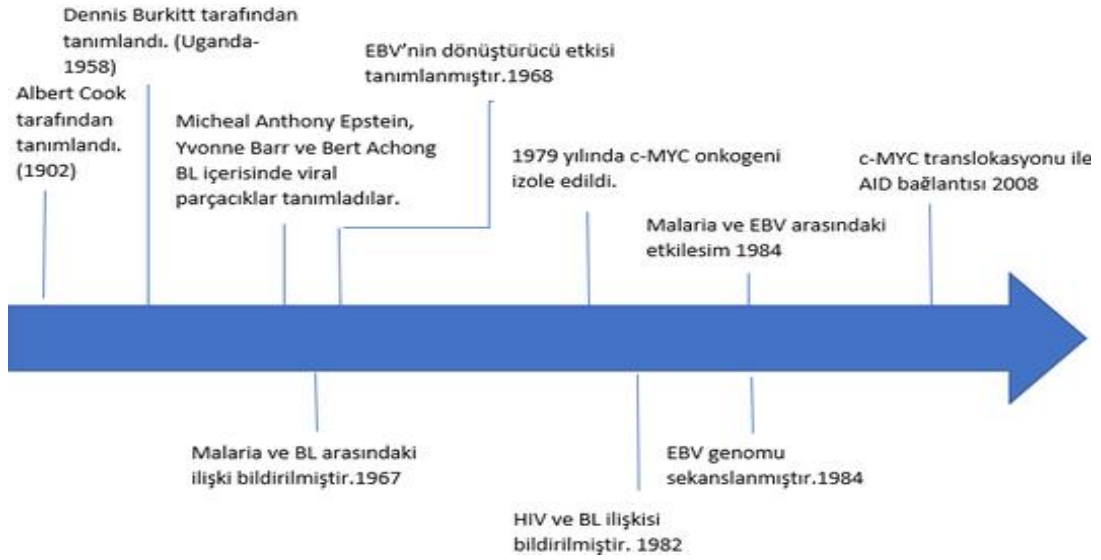
2018). EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücrelerindeki miRNA ifade profili bize EBV ve BL arasındaki yolağa dair fikir verebilir. EBV'nin bu süreçte hücresel miRNA profilini etkilemesi muhtemeldir. Özellikle B hücre farklılaşma sürecinde rol alan miRNA ifade farklılıkları (Zhang, Jima et al. 2009) bize EBV ve BL patogenezi hakkında oldukça fikir verebilir. MiRNA'lar apoptoz, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu gibi birçok yolda düzenleyici olarak görev almaktadır (Sirotkin, Lauková et al. 2010). EBV ve BL arasındaki ilişkide de düzenleyici olmaları muhtemeldir. Bu nedenle çalışmamızda B lenfosit oluşum yolağında regülatör olarak görev alan *BLIMP1* ve *XBP1* genlerini hedefleyen (in-siliko araştırmalar sonucu) üç miRNA (miR-182, miR-320a, miR-144)'nın ekspresyon seviyelerine bakıldı. Burada EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına bakılarak EBV ve BL arasındaki ilişkiye dair düzenleyici olabilecek miRNA belirlenmek amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Burkitt Lenfoma Tanım ve Tarihçesi

BL, ilk olarak 1958 yılında Denis Burkitt tarafından ‘Yaygın Büyük B hücreli Lenfoma’ olarak tanımlanmıştır (Burkitt 1958). Fakat erkek hastasının çene tümörüne şüpheli yaklaşarak bu tümöre dikkat çeken ilk kişi ise Uganda’da yaşayan Doktor Albert Cook’tur. Albert Cook’un şüpheli yaklaşımı burada yaşayan patoloğlar tarafından araştırılma yapılmasına neden olmuştur (Magrath 2012). Bu nedenle BL tanımının ortaya çıkışında önemli bir yer tutmaktadır. Sonrasında yapılan çalışmalarla doğu, batı ve orta Afrika’da çocukluk çağı lenfomaları ve çene tümörlerinin sıklığı dikkat çekmiştir ve bunun üstünde durulmuştur (Molyneux, Rochford et al. 2012).

BL’nin klinik olarak tanımını ilk olarak Denis Burkitt yapmıştır (Burkitt 1958). Burkitt daha öncesinde teşhis olarak Disgerminom konan kız çocuklarının hepsinin olmasa da çoğunun aynı tümöre sahip olduğunu düşünüyordu. Sonrasında Mulago’da Dennis Burkitt’ten bağımsız olarak çalışan Amerikalı bir patoloğ olan Gregory O’Conor, Burkitt ile aynı zamanda patoloji departmanı başkanı Jack Davis ile iş birliği yaparak, yaklaşık 7 yıl önce Kampala’da kurulan kanser kayıtlarına bildirilen çocukluk çağı kanser vakalarının yaklaşık yarısının lenfoma olduğunu kabul etti (O’conor and Davies 1960). Böylece 1960 yılında George O’Connor, kanserin lenfoma soyundan geldiği sonucuna varmıştır. Bu gelişmeler neticesinde tümörün Afrika, Papua Yeni Gine’deki yoğun insidansı sebebiyle araştırmacılar bölgeye özgü bir tümör olarak düşünmüşlerdir. Bu nedenle ‘Afrika lenfoması’ olarak adlandırılmıştır (Dorfman 1965) Sonrasında DSÖ 1969 yılında tümörün tamamen histokimyasal analizlerle tanımlanması gerektiği kararı bir gerçeği ortaya çıkarmıştır. Yapılan çalışmalar neticesinde tümörün çene ayırt edici klinik özelliği olmadan insidansa bağlı olarak ortaya çıktığına karar verilmiştir (Organization, 1969). Böylece tümörün oldukça yaygın olduğu Afrika, Papua Yeni Gine bölgesinde görülen tümöre ‘Endemik BL’, daha düşük insidansa sahip Avrupa’da görülen BL’ye ise ‘Sporadik BL’ denilmiştir. Fakat sonrasında HIV ile BL ilişkisi fark edilmiş ve immün yetmezlikle ilişkili BL 1982 yılında 3.bir alt tip olarak eklenmiştir (Swerdlow, Campo et al. 2008).



Şekil 2.1. BL'nin anlaşılmasında kilometre taşları (Molyneux, Rochford et al. 2012).

2.1.1. Burkitt Lenfoma Sınıflandırması

DSÖ'ne göre BL için üç varyant bulunmaktadır. Endemik, sporadik ve immün yetmezlik olarak adlandırılan bu üç alt tip genetik ve morfolojik olarak benzerlik göstermektedir (Molyneux, Rochford et al. 2012). Sporadik BL için sıtmanın olmadığı bölgelerde baskın BL alt tipi de diyebiliriz. Ağırlıklı olarak Kuzey Amerika ve Avrupa bölgesinde dağılım göstermektedir (Roman and Smith, 2011). Üç alt tip arasında insidans, daha etkin olarak ortaya çıktıkları coğrafi konum ve klinik sunum farklılıklar göstermektedir (Bishop, Rao et al. 2000) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. BL alt tipleri arasında karşılaştırma (Bishop, Rao et al. 2000, Brady, MacArthur et al. 2008)

	Endemik BL	Sporadik BL	HIV-İlişkili BL
Coğrafi Lokasyon	Papua Yeni Gine ve Afrika	Kuzey Amerika ve Avrupa	Amerika ve Avrupa
İnsidans	5-10/100.000	0.02/100.000	1000 AIDS Vakasında ~6

Klinik Sunum	Çocuklarda; Çenede, Yüz Kemiklerinde, Kemik İliğinde, Yumurtalıklarda Yerleşim	Yaşça Daha Büyük Çocuklarda ve Yetişkinlerde; Karın, Kemik İliği, Yumurtalık, Böbreklerde Yerleşim	Yetişkinlerde; Lenf Nodlarında, Karında ve Kemik İliğinde Yerleşim
Kofaktör	EBV, Malaria	--	HIV

BL, morfolojik olarak da DSÖ tarafından ikiye ayrılmıştır. Bu iki varyant; plazmasitoid farklılaşması sebebiyle Burkitt lenfoması ve atipik Burkitt / Burkitt benzeri lenfomadır (Jaffe, 2001). Burada klasik tip BL, EB ve çocuklarda görülen sporadik BL’de yoğunken, sporadik ve immün yetmezlikle ilişkili BL’de oldukça az görülmektedir. Yetişkinlerde meydana gelen sporadik BL ise genellikle Burkitt benzeri lenfomadır (Ferry, 2006).

2.1.2. Epidemiyolojisi

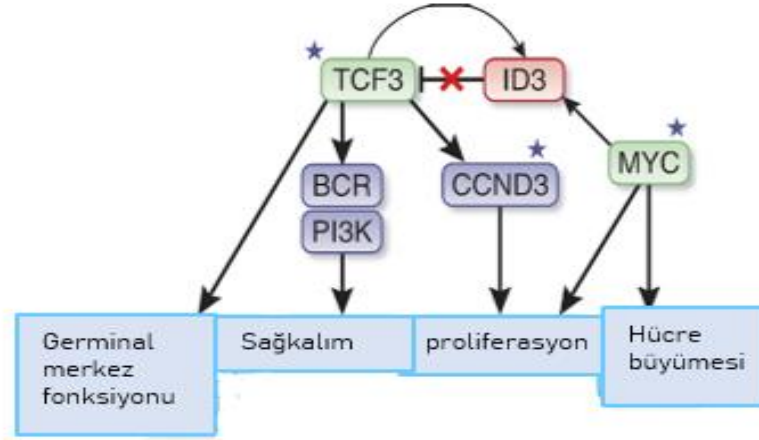
Burkitt lenfoma oldukça agresif bir tümör olmakla beraber tüm yaş gruplarında görülen lenfomaların yaklaşık %3 ile %5’ini oluşturmaktadır. İnsidansı asıl olarak coğrafik dağılımına bağlı ifade edilmektedir (Bishop, Rao et al. 2000). İlk olarak Afrika’da tanımlanan çocukluk kanseri BL hala Afrika’da en yaygın çocukluk çağı tümörüdür. BL çocuklarda 0-14 yaş aralığında oldukça değişken bir insidansa sahiptir ve 100.000 kişide birkaç kişiden 18 kişiye kadar değişkenlik gösterebilirler (Magrath, 2012). Afrika, Papua Yeni Gine bölgesinde yıllık olarak milyonda 40-50 çocuk BL tanısı almaktadır. Endemik BL’nin bu sıklığı çocukluk çağı tümörlerinin %50’sini ifade ederken, Afrika’daki tüm tümör tanılarının %90’ına karşılık gelmektedir (Molyneux, Rochford et al. 2012). Aynı zamanda Afrika’da görülen BL insidansının Amerika’daki BL vakalarına kıyasla 50 kat fazla olduğu bilinmektedir (Freedman, Aster et al. 2020). BL, Amerika ve Batı Avrupa’da yetişkin lenfomasının %1-2’sini, çocukluk çağı tümörlerinin ise %40’ını oluşturmaktadır (Ferry, 2006). Cinsiyet olarak ele aldığımızda ise erkeklerde kadınlara oranla 2 katı fazla BL teşhisi konduğu gözlenmiştir (Magrath, 2012).

2.1.3.Etyopatogenezi ve Moleküler Biyolojisi

BL, *MYC* translokasyonu ile karakterizedir (Schmitz, Young et al. 2012). 8q24 kromozomunda lokalize olan *MYC*, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu regüle eden c-myc proteinini kodlamaktadır BL ise *MYC*'in aşırı ekspresyonu ile karakterize olmuş durumdadır (Pelicci, Knowles 2nd et al. 1986). Bu genin aşırı ekspresyonu ile BL yakından ilişkilidir. BL en sık kromozom 8'in uzun kolu (*MYC* genini taşır) ile kromozom 14 üzerindeki Ig ağır zincir geninin translokasyonunu taşımaktadır (Shiramizu, Barriga et al. 1991). Buradaki aşırı c-myc ekspresyonu BL hücrelerinin bölünme hızını ikiye katlamaktadır (Kalisz, Alessandrino et al. 2019). Bazı BL örneklerinde yapılan karyotip analizlerinde ise, moleküler çalışmalar göstermiştir ki yetişkinlerde herhangi kromozomal bozukluk olmadan BL saptandığı da görülmektedir. Fakat özellikle çocukluk çağı BL'sinde karmaşık kromozom yapıları gözlenmektedir. 1q, 12q ve 7q da duplikasyonlar, 6q,13q ve 7q da ise delesyonlar gözlenmektedir (Nelson, Perkins et al. 2010). Buradaki 13q ise sonuç ve risk değerlendirilmesinde önemli bir faktör olarak görülmüştür (Nelson, Perkins et al. 2010).

BL patogenezinin iki önemli şekilde başladığı bilinmektedir. EBV ve *MYC* onkogeninde meydana gelen translokasyon BL patogenezinin başında yer almaktadır (Lombardi, Newcomb et al. 1987). Yapılan bir çalışmada BL'nin sahip olduğu somatik mutasyonlara da dikkat çekilmiştir. Çalışma sonucunda BL'nin *TCF3* (transkripsiyon faktörü-3) ve bunun negatif inhibitörü *ID3*'ün somatik mutasyon taşıdığı belirtilmiştir (Campo, 2012). Sporadik ve immün yetmezlikle ilişkili BL'nin %70'i *TCF3* mutasyonu taşıırken, endemik BL'nin %40'ının *TCF3* mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan fonksiyonel çalışmalar göstermiştir ki *tcf3* proteini ve mutasyona uğramış *ID3*, BL hücrelerinin hayatta kalmalarında ve proliferasyonda rol almaktadır (Schmitz, Young et al. 2012). *TCF3*, PI3K yolu aracılığıyla BCR sinyalini güçlendirip, yoğunlaştırarak BL hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. Ayrıca *CCND3* gibi hücre döngüsü ile ilişkili genleri modüle ederek yukarı regüle olmalarını sağladığı gösterilmiştir (Schmitz, Young et al. 2012). Bu da proliferasyondaki rolünü açıklamaktadır. Fare modelinde yapılan bir çalışmada ise PI3K sinyal yolağının *MYC* translokasyonu ile iş birliği yaptığı ve *CCND3* mutasyonlarının da olduğu insanlardaki lenfomanın geliştiği gözlenmiştir (Sander, Calado et al. 2012). *MYC* translokasyonu,

CCND3, *TCF3* mutasyonlarının ve böylece PI3K sinyal yolundaki değişimlerin BL’de bir iş birliği yaptığı açıktır (Campo, 2012).

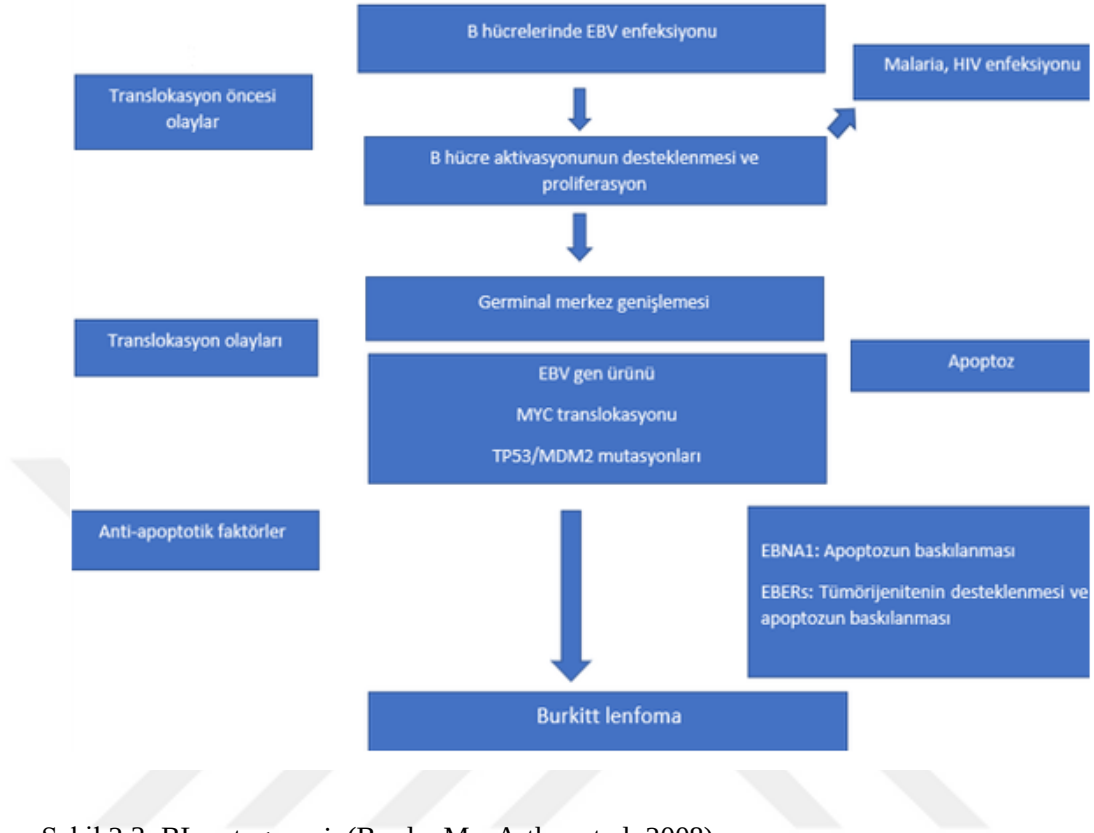


Şekil 2.2. BL’de somatik mutasyonlar (Campo 2012).

Yapılan çalışmalarda ise somatik mutasyonların (*TCF3*, *CDDN3* mutasyonları gibi) sporadik BL’lerin %38’inde görülürken endemik BL’lerin ise çok küçük bir kısmında görülmektedir (Schmitz, Young et al. 2012). Bunun sebebi de endemik BL’de özellikle kofaktör görevi gören başka etkenlerin olmasıdır. BL’de sıtma, EBV ve/veya HIV enfeksiyonu kofaktör görevi görürler. Sıtma holo-endemik olarak Afrika ve Papua Yeni Gine’de enfeksiyona sebep olmaktadır (Mawson and Majumdar 2017). Bu enfeksiyonla birlikte aynı zamanda vakaların %100 EBV pozitif olduğu saptanmıştır (Kelly and Rickinson 2007).

Endemik BL vakalarının %95’i EBV pozitifken, sporadik BL vakalarının %20’si EBV DNA’sı taşımaktadır. Burada EBV’nin B hücrelerini enfekte etmesi ile erken onkojenik olayları indüklediği ve aynı zamanda da *MYC* translokasyonunu indüklediği düşünülmektedir (Bishop, Rao et al. 2000). Ayrıca EBV gen ürünü olan bcl-2 homologu bhrfi’nin apoptozu baskıladığı gösterilmiştir (Fanidi, Hancock et al. 1998). EBV’nin, c-myc eksprese eden BL hücrelerinde apoptoza dayanıklı hale geldiği de bildirilmiştir (Kelly, Milner et al. 2006). EBV, böylece hücre ölümsüzlüğüne katkıda bulunarak BL patogenezinde rol almaktadır. Ayrıca EBV pozitif BL’lerde anlamlı derecede eksprese edilen Epstein-Barr Nükleer Antijen 1 (EBNA1) proteininin c-myc translokasyonunu indüklediği hatta EBNA1’in tek başına proliferasyonu indüklediği bilinmektedir (Wilson and Levine 1992). Fakat hala EBV ve onun gen ürünlerinin BL patogenezinde aydınlatılmamış noktalar vardır. Aynı zamanda

endemik BL'nin sıtma ve EBV ile yakından ilişkisi ve BL patogenezindeki rolleri merak edilmektedir (Poirel, Ambrosio et al. 2019).



Şekil 2.3. BL patogenezi (Brady, MacArthur et al. 2008).

2.1.4. Morfoloji ve İmmünohistokimyasal Özellikleri

BL karakteristik olarak yaygın bir proliferasyon ile birlikte yıldızsı bir gökyüzü görünümünde karşımıza çıkar. Yüksek proliferasyon gösteren, mitoz hızı bilinen BL'nin bu yıldızsı gökyüzü görüntüsü birçok molekülü barındırır (Dunleavy 2018). Buradaki hücreler yuvarlak, orta boy ve genelde birbiri ile uyumlu bir görüntü sağlarlar. Çekirdekler homojendir ve yuvarlaktan ovala doğru geçiş sağlayabilmektedirler. Mikroskopik olarak kümelenmiş bir kromatin, berrak bir parakromatin ve iki ila beş arasında bazofilik çekirdeğin merkezi yerleşimi gözlenebilmektedir (Jaffe 2001). Fakat BL'de hücrelerde nükleer düzensizlik veya varyasyon derecesinde farklılıklar gözlenebilir. Atipik olarak farklı şekiller ve düzensizlikler olabileceği belirtilmiştir. Burada atipik morfolojiyi yetişkinlerde daha sık görüldüğü ve sebebinin HIV enfeksiyonu olabileceği belirtilmiştir (Poirel, Ambrosio et al. 2019).

İmmünofenotipte ise, BL’de B hücre antijenleri (CD19, CD20, CD22, CD79a, PAX5) ve germinal merkez işaretleri olan CD10, BCL6, CD38, CD77 ve CD43 de sıklıkla pozitifdir (Montes-Moreno, Roncador et al. 2008) fakat BCL2 genellikle negatiftir (Hummel, Bentink et al. 2006). BCL6 +, CD10 +, CD38 + kombinasyonu gösterir (Kelly and Rickinson, 2007). Tipik olarak orta zincirde ve hafif zincir restriksiyonunda IgM ekspresyonu gösterdiği bilinmektedir. Bununla birlikte MYC-IgM negatif vakaların hepsinde, hücrelerin çoğunda MYC protein ekspresyonu yüksektir (Poirel, Ambrosio et al. 2019). Ayrıca, proliferasyonunun Ki67 ile ölçüldüğünde neredeyse %100 oranında yüksek olduğu gösterilmiştir (Harris, Jaffe et al. 1994). BL’nin immünofenotipik olarak GC hücrelerine benzediği ve hatta B hücrelerinin BL’de köken hücreleri olduğu rapor edilmiştir. GC, B hücrelerinin olgunlaştığı, somatik hipermutasyonların ve farklılaşmanın gerçekleştiği bir aşamadır (Giulino-Roth and Cesarman 2013). Normal GC hücreleri, naif B hücreleri ve hafıza B hücreleri ile yapılan ekspresyon çalışmasında BL’ gen imzasının GC ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Piccaluga, De Falco et al. 2011).

2.1.5. Klinik Özellikleri ve Tanısı

BL, epidemiyolojik olarak farklı görünümelerde karşımıza çıkabilir. Asıl BL tanısının gerçekleştiği Afrika endemik Burkitt lenfomada çocuklarda özellikle çene bölgesinde yerleşim görülmektedir (Cohen, 2000). Klinik olarak bakıldığında; BL farklı bölgelerde lokalize olabilmekle birlikte kafada lokalize olduğunda dişlerde bozulma ve hava yollarında tıkanıklık görülebilir. Karın tutulumu göstererek büyük bir kitle oluşturabilir. Burada bağırsak duvarının kalınlaşması ve kanama gerçekleşmesi görülebilir (Poirel, Ambrosio et al. 2019). Böbrek, göğüs ve çekumda ekstra-nodal tutulum gözlenebilir. Endemik BL tüm alt tipleri gibi MYC translokasyonu taşıırken %40 oranında *IC3* ve *TCF3* mutasyonu da taşıyabilmektedir. %1.8 oranında *CCND* mutasyonu taşıdığı raporlanmıştır (Dunleavy, Little et al. 2016). Vakalar çoğunlukla çene ve boyun kısmında tümör göstermektedir. Sporadik BL’de ise çene tutulumu sık rastlanılan bir durum olarak değerlendirilmemektedir. İmmün yetmezlik ile ilişkili BL’de ise çekum, kemik iliği ve lenf düğümlerinde tutulumla sık rastlanılmaktadır. Sporadik BL sıklıkla karın bölgesinde yerleşim göstermekle birlikte, kemik dahil kemik iliği, göğüs, böbrekte de klinik sunum gösterebileceği belirtilmiştir. Ayrıca, MSS tutulum riski yüksektir. Özellikle ileri aşamalarında MSS tutulumu her alt tipinde rastlanılan bir durumdur (Dunleavy, Little et al. 2016). Vakaların %25-40’ı

EBV ile ilişkilendirilmiştir. Tüm vakalarda olduğu gibi EBV pozitif BL’de MYC translokasyonu göstermektedirler (Dunleavy, Little et al. 2016).

2.2.Epstein-Barr Virüsünün Keşfi ve Epidemiyolojisi

Epstein-Barr virüsü (EBV)’nün aslında primat virüsü olduğu bilinmektedir. Herpes-virüslerin hayvanlarda tümör ile ilişkili olduğu aslında 1960’lardan beri bilinmekteydi. Fakat insanlarda tümör ile Herpes virüs ilişkisine dair ilk orijinal bilgiler Afrika’da alışılmadık lenfoma üzerinde yapılan çalışmalar sonucu alındı (Epstein and Achong 2012). Burkitt lenfomanın keşfedilmesinden sonra birçok laboratuvarın ana konusu Burkitt lenfoma haline gelmiştir. Sürecin ilk adımı ise Uganda’da alınan biyopsi örnekleri Londra’daki Middlesex hastanesine gönderilmesidir. Burada M. Anthony Epstein, B. G. Achong and Y. M. Barr çalışmalar yapmışlardır örneklerden hücre kültürleri oluşturulmuştur ve elektron mikroskopunda viral parçacıklar tespit edilmiştir (Epstein ,1964). Daha sonrasında bu virüs Epstein-Barr olarak anılmaya başlanmıştır.

Morfolojik yapısı ve DNA’sı hakkında bilgi sahibi olundukça Herpes virüsü olduğunu düşündürmüştür. Çalışmalar sonucu EBV’nin *Herpesviridae* ailesinden *lympho crypto-virus* cinsinin bir üyesi olduğu kesinleşmiştir. Sonrasında ise EBV’nin mononükleaz, non-hodgkin lenfoma ile ilişkili olduğu fark edilmiştir (Henle, Henle et al. 1979). Yapılan çalışmalarda EBV DNA’sının farklı tümörlerde de tespit edilmesi EBV’yi birçok tümör patogenezi ile ilişkilendirmiştir (Murata and Tsurumi 2014). EBV’nin B hücrelerini enfekte etmesi ve B hücrelerinin tercihli enfeksiyonu nedeniyle EBV’nin sebep olduğu B hücreli lenfoma listesi oldukça uzundur. Bu nedenle 1997 yılında DSÖ tarafından EBV bir tümör virüsü olarak sınıflandırılmıştır (Grywalska and Rolinski 2015).

EBV, ne kadar ilk olarak Burkitt lenfomada tanımlanmış (Epstein, 1964) ve birçok karsinomla ilişkilendirilmiş olsa da aslında EBV zaten tüm insanların %90’ından fazlasını enfekte eden bir virüstür (Henle, Henle et al. 1969). Aseptomik olarak sessiz kalan virüs oldukça yaygındır. Oral yolla taşınımı sağlanan EBV tükürük ile bulaşır. Bu nedenle özellikle çocuklarda primer enfeksiyon daha hızlı olmaktadır. Ayrıca sosyoekonomik düzeyle ilişkilendirilen EBV sosyoekonomik düzeyi düşük ülkelerde hijyen eksikliğinden dolayı EBV’nin böyle bölgelerde daha sık görüldüğü bilinmektedir (Macswen and Crawford 2003).

EBV epitel hücreleri ve lenfositleri enfekte eden ve tümörle ilişkilendirilen ilk tümör olma özelliğini taşır. EBV sadece BL değil çok sayıda çeşitli tümör ile ilişkilidir (Ko, 2015). Nazo-farengeal karsinom, Hodgkin lenfoma, gastrit karsinom ve lenfoproliferatif bozukluklarla ilişkilendirilmiştir (Tempera and Lieberman 2014).

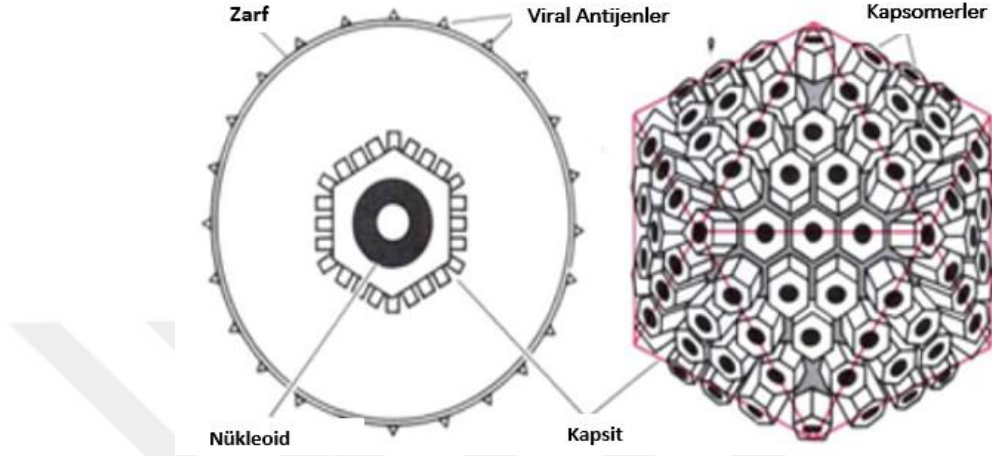
Tablo 2.2. EBV hedef hücreleri ve ilişkili olduğu bazı tümörler veya bozukluklar (Shannon-Lowe and Rickinson 2019).

	Hedef Hücre	İlişkili Hastalık
Epstein Barr Virüsü	B Hücresi	Hodgkin Lenfoma
		Burkitt Lenfoma
		B-Lenfoproliferatif Bozukluk
	Epitel Hücre	Gastrit Kanseri
		Nezofarengal Kanser
	T ve NK Hücreleri	T-NK Proliferatif Bozukluk

2.2.1.EBV'nin Genel Özellikleri

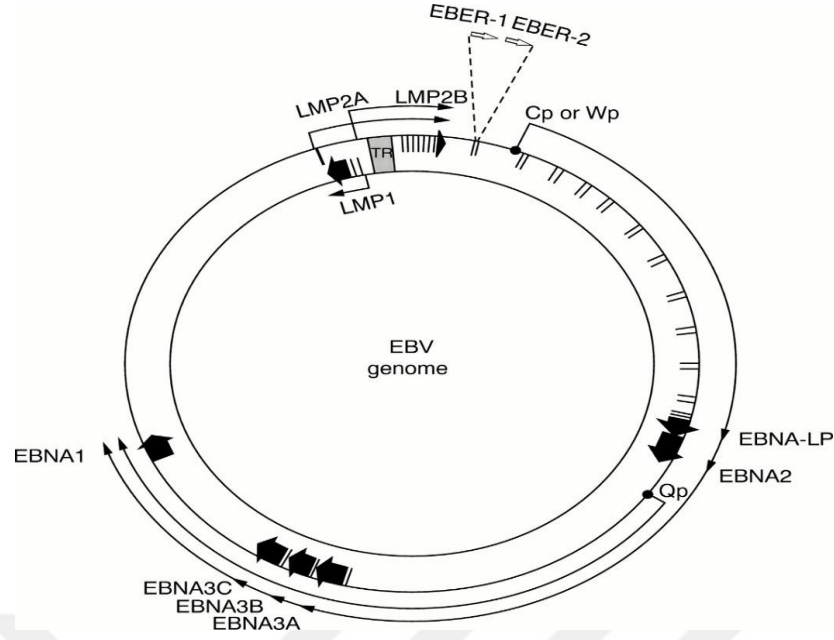
EBV, 172 kb'lık genomu ile gama-herpes virüs ailesindeki diğer üyeler gibi çift zincirli DNA'ya sahiptir (Küppers, 2003). Molekül internal ve terminal tekrar alanlarına benzersiz şekilde bölünmüştür (Straus, Cohen et al. 1993) Virüs partiküllerinde, kaosit içerisinde genom lineer formdadır ve etrafında viral zarf çevrilidir (Şekil 2.4) (Cohen, 2000). EBV lineer genom formunda yaklaşık 100 adet viral protein kodlamaktadır. Bu proteinler viral genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde, virion yapısındaki bileşenlerin oluşumunda ve ana immün yanıtın düzenlenmesinde önemlidirler (Cohen, 2000). EBV'nin 172 kb'lık genomu yaklaşık 80 protein ve 46 fonksiyonel kodlanmayan RNA ifade eder (Farrell, 2019). Viral genom her iki uçta da 0.5 kb'lık terminal ve internal tekrar bölgeleri içermektedir. Ve bu bölgeler genomu uzun ya da kısa benzersiz dizileri bölmeye yarayan domain

bölgeleri içermektedir. Aynı zamanda EBV diğer Herpes virüsler gibi çift sarmallı DNA'ya sarılmış toroid şekilli proteinler bulundurur yapısında. Nükleokapsidi 162 kapsomerden oluşmaktadır (Rickinson, 1996).



Şekil 2.4. EBV yapısı (Henle, Henle et al. 1979).

EBV'nin ana hedefi B lenfositlerdir. Lineer formdaki DNA enfeksiyon sonrası B hücrelerinde latent formda ekstra-kromozomal olarak sirküler yapıya geçer (Crawford, 2001, Küppers , 2003). Burada enfekte hücrelerin çekirdeklerinde epizom oluşturarak enfeksiyonu başlatır. Böylece yeni viral partikülleri üretebilir, enfekte hücrelerin ölmesiyle sonuçlanan viral parçacık salınımını gerçekleştirir. Olgun virüs kapsüllenerek konak içerisinde çoğalma ve salınım sağlar (Küppers 2003). EBV insanları iki tip yani iki suş ile enfekte edebilir. Bu iki tip arasındaki fark latent enfeksiyon sırasında sekansta farklı genlerin eksprese olması ve B lenfosit dönüştürme kabiliyetlerinin farklı olmasıdır (Cohen, 2000).



Şekil 2.5. EBV gizli genlerinin çift sarmallı viral DNA epizomu üzerindeki konumu ve transkripsiyonu (Young, Dawson et al. 2000).

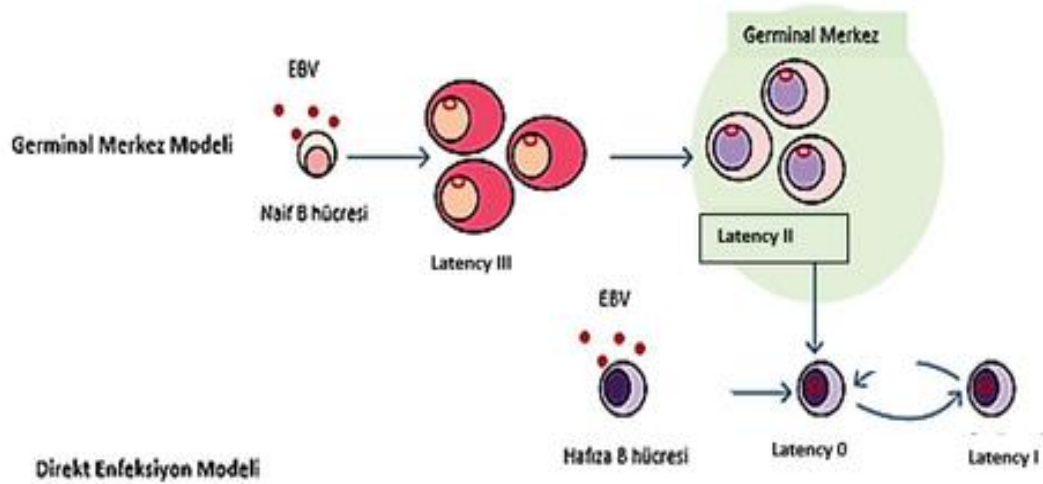
İçerideki oklar gizli proteinlerin kopyalanma yönlerini ve kodlama ekzonlarını ifade ederken açık oklar poli-adenile olmayan RNA'ları, EBER'leri ifade eder. EBNA-LP, BamH1-W fragmanlarındaki değişken sayıda tekrarlayan ekzonlardan kopyalanır ve LMP2, viral epizomu üretmek için lineer DNA'nın daireselleştirilmesi sırasında oluşan TR bölgesinin her iki yanında yer alan çoklu ekzonlardan oluşur. Dıştaki uzun oklar, tüm EBNA'ların ya Cp ya da Wp promotöründen kopyalandığı tip III latensi EBV transkripsiyonunu temsil eder. İçteki daha kısa oklar, BamH1-Q bölgesinde bulunan Qp promotöründen kaynaklanan EBNA1 transkriptini temsil eder; EBNA1, latensi I ve II'de kopyalanır (Young, Dawson et al. 2000)

2.2.2.EBV'nin Yaşam Döngüsü ve B Hücre Enfeksiyonu

EBV'nin bulaşıcı yaşam döngüsüne ait bilgiler IM'deki gözlemlere dayanmaktadır (Macswen and Crawford 2003). EBV oral yolla tükürükte taşınır. Bu nedenle orafarankteki epitel hücrelerini ya da burada bulunan dinlenme durumundaki B hücrelerini enfekte eder. Burada başlayan enfeksiyon daha sonra B hücrelerini enfekte ederek devam eder. Primer enfeksiyonda EBV ile enfekte olmuş B hücreleri virüs üretimi ile litik enfeksiyona veya latent viral ekspresyonuna maruz kalır. EBV, B hücrelerine girmeden önce ana zarf glikoproteini olan gp350 ile B hücre yüzeyinde bulunan CD21 (C3d komplement reseptörü) viral reseptöre bağlanır (Cohen, 2000). Ancak CD21'e ek olarak diğer faktörler de enfeksiyon için oldukça önemlidir. Diğer

faktörler kısmında özellikle MHC sınıf II molekülü B hücre enfeksiyonunda bir kofaktör olarak görev alır (Li, Spriggs et al. 1997). EBV, B hücrelerini enfekte ettikten sonra lineer EBV genomu dairesel forma geçer. Burada bir epizom oluşturur. EBV burada sitotoksik T lenfositleri tarafından kontrol altında tutulur. Fakat EBV reaktivasyona uğrayarak B hücrelerinde latent ve litik formda yaşam döngüsüne devam edebilir. Bu da B hücrelerinin ölümsüzleşmesi ile sonuçlanır (Cohen, 2000) (Şekil 2.6).

Latent formda EBV'ye özgü eksprese edilen 100'e yakın proteinden sadece 10 tanesi eksprese edilir. EBV, protein sayısını azaltarak tanınmayı zorlaştırmayı ve sitotoksik T lenfositlerinden kaçmayı hedefler. İki tip çevrilmemiş RNA, 6 nükleer protein ve 2 zar proteini ile latent formda bağışıklık cevabından kaçabilir (Cohen, 2000). Burada özellikle EBNA1 büyük rol oynar. EBNA1 viral proteinine bağlanarak EBV genomunun B lenfositlerine dairesel bir DNA epizomu olarak tutunmasını sağlar (Cohen, 2000). Bu etkileşim DNA replikasyonu için önemlidir ve böylece proliferatif hücrelerde yavru hücrelere DNA aktarımında da rol alır EBNA1 (Yates, Warren et al. 1985). EBNA1, MHC I sınıf molekülleri tarafından sunulmaz ve böylece sadece EBNA1 ekspresyonu olan EBV pozitif B hücrelerinde sitotoksik T lenfositleri EBV'yi tanıyamaz (Levitskaya, Coram et al. 1995). EBNA2 ise hücrel dönüşüm için gereklidir. LMP1, LMP2A gibi bazı gizli zar proteinlerinin düzenlenmesinde rol alır. LMP1 ise anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek apoptozu inhibe eder. LMP2A ise immüno-reseptör tirozin tabanlı aktivasyon motifleri taşır. Bu motifler aynı zamanda BCR koreseptörleri taşırlar ve böylece BCR sitümilasyonu sonrası sinyal iletiminde de görev alır. LMP2A, BCR tirozin kinazlara bağlanarak BCR sinyallerini inhibe eder (Miller, Burkhardt et al. 1995). EBV'nin litik döngüye girişi sağlanır. EBER'ler ise IL-10 salgısını indükleyerek enfekte B hücre büyümesini ve T hücrelerinden kaçışı kolaylaştırır (Wilson, Bell et al. 1996).



Şekil 2.7. B hücresinde EBV yaşam döngüsünün iki modeli (Vockerodt, Yap et al. 2015)

EBV'nin enfekte olmuş bireylerde en çok uzun ömürlü hafıza B hücrelerinde olması ise virüsün oraya nasıl ulaştığına dair iki ayrı model çıkarmıştır. EBV, B hücrelerini 'Germinal merkez modeli' ve 'Doğrudan Enfeksiyon Model'i olmak üzere iki şekilde enfekte etmektedir. Germinal merkez modelinde naif B hücrelerinin enfekte olması ile latensi III periodunu görmekteyiz. Latensi III periodunda EBNA'lar, LMP'ler ve EBER'ler ifade edilirler (Vockerodt, Yap et al. 2015). Buradan Germinal merkeze giren naif B hücreleri latensi II periodu sayesinde farklılaşma sinyalleri alır ve böylece hayatta da kalır. Latensi II periodunda EBNA1 dahil olmak üzere diğer EBNA'ların ve LMP1, LMP2'inin ifade edilmediği bir süreçtir (Babcock, Hochberg et al. 2000). EBV ile enfekte olmuş hafıza B hücreleri sitotoksik T lenfositlerinden kaçabilmek için gizli gen ekspresyonunu aşağı düzenleyerek (ki buna latensi 0 denir) bağışıklık sisteminden kaçabilmektedirler. Sonrasında yaşamsal faaliyetlere devam etmek ve viral epizomu yavru hücrelere aktarabilmek için EBNA1 ifade edilmeye başlanır(Hochberg, Middeldorp et al. 2004). Bu kısım latensi I'dir. Doğrudan enfeksiyon modeli ise hafıza B hücrelerinin EBV tarafından direkt enfekte olduğunu savunmaktadır(Vockerodt, Yap et al. 2015).

2.2.3.Burkitt Lenfoma Patogeneğinde EBV

BL'nin orjin hücresi somatik hipermutasyona uğramış olgun bir B hücresidir. Somatik hipermutasyona uğramış olgun B hücresinin GC karanlık alan tarafından türetildiği görülmektedir (Poirel, Ambrosio et al. 2019). İmmünoglobulin somatik

hipermutasyona uğramış proliteratif B hücreleri tarafından türetildikleri yapılan gen ekspresyon çalışmaları ile uyushmaktadır (Victora, Dominguez-Sola et al. 2015). Fakat bu çalışmalar EBV negatif sporadik BL örneklerinde yapılmıştır (Poirel, Ambrosio et al. 2019).

EBV'nin onkojenik bir virüs olduğu bilinmektedir. EBV'nin BL patogenezindekine rolüne baktığımızda burada bir kofaktör olarak işlev görür ve oldukça önemlidir (Grömminger, Mautner et al. 2012). EBV, BL'nin tüm alt tiplerinde görölmektedir. Özellikle endemik BL'nin büyük bir kısmı EBV pozitifdir (Pattle and Farrell 2006). Endemik BL'de yapılan çalışmalar sonucunda EBV'nin BL'de genomik instabilitiyi bozduğu görölmüştür (Kamranvar, Gruhne et al. 2007). Ayrıca Malaria ile de ilişkilendirilmiştir. *Plasmodium falciparum* titreleri barındıran kişilerde de EBV pozitif BL insidansının yüksek olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda sporadik ve HIV ile ilişkili BL'de de sırasıyla %25 ve %40 EBV pozitiflik gözlenir (Dunleavy, Little et al. 2016). EBV ile BL arasındaki ilişki tümörde görölme sıklığı (özellikle endemik BL) ve EBV+ BL'lerin virüsü malign klonların tümünde her hücrelerinde taşımalarıdır (Kelly and Rickinson 2007). Ayrıca, Magraht c-myc ifadesi ile EBNA1 benzerliğine dikkat çekmiş ve EBV pozitif BL patogenezinin bu noktada ilişkili olabileceğinden bahsedilmiştir (Magraht, 1990).

BL'de EBV latent III periodunun tamamını göstermemektedir çünkü bu period c-myc ekspresyonu ile uyumlu değildir. EBV BL'de tipik olarak EBNA ekspresyonuna sahip olduğu latent I enfeksiyonu taşır. BL'de sadece alternatif promotör Qp'den EBNA1 ekspresyonu olduğu (Rowe, Rowe et al. 1987) aynı zamanda BARTS ve EBER transkriptlerinin de olduğu bir latensi periodu mevcuttur (Kelly and Rickinson 2007). Ek olarak da EBNA 1, 3A, 3B, 3C'nin de promotör Wp tarafından eksprese edildiği görölmektedir. Buradaki önemli nokta ise EBNA2 geninin olmaması ile EBNA2 tarafından indüklenen LMP proteininin eksprese olmamasıdır. Böylece c-myc ile uyumlu bir model oluşur (Kelly and Rickinson, 2007). Ayrıca, EBV ve BL arasındaki önemli bir kanıt yine c-myc dolayısıyla elde edilmiştir. c-myc sadece hücre proliferasyonunu değil aynı zamanda apoptozu indükler (Vockerodt, Yap et al. 2015). Bununla beraber, BL hücre hatlarının apoptoz inhibe edici bir mekanizmaya gereksinim duyması normaldir. Yapılan bir çalışmada da EBV pozitif BL hücre hatlarının EBV negatif hücre hatlarına kıyasla apoptoza daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Çalışmada viral epizomları yok edilen hücre hatlarının EBV pozitif BL

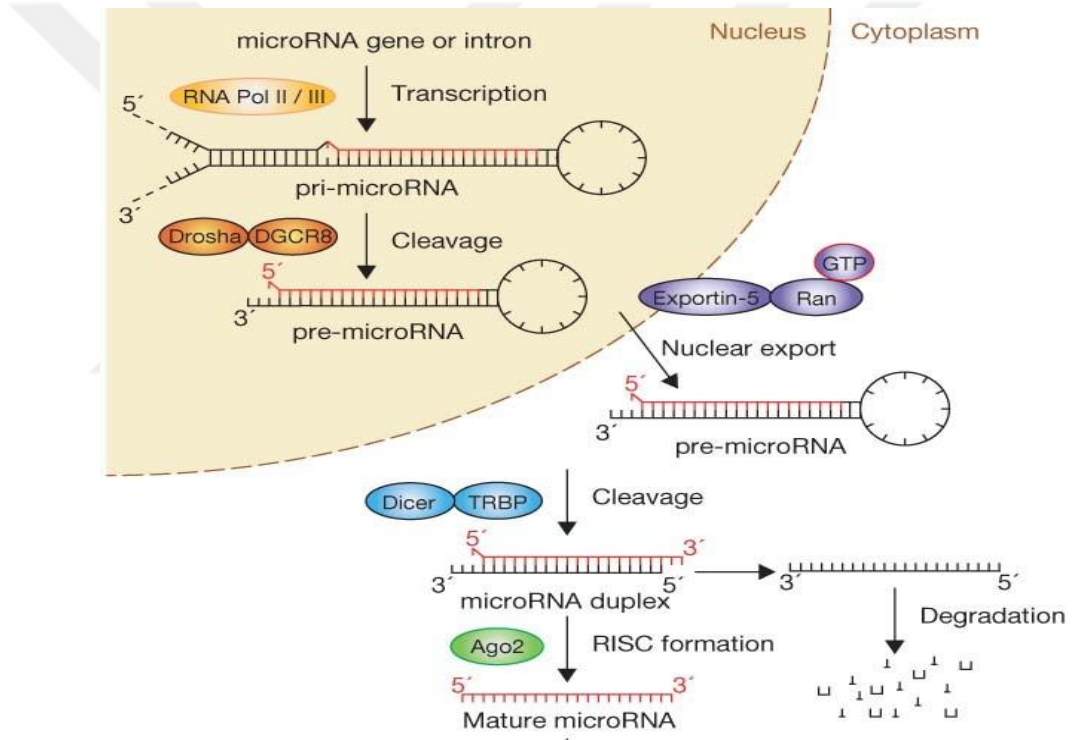
mutasyona sahiptir. Aynı zamanda EBV negatif BL hücreleri devam eden mutasyonlar göstermemekle beraber antijen seleksiyonundan da yoksundur (Bellan, Lazzi et al. 2005, Leucci, Onnis et al. 2010). Burada sonuç olarak şu çıkarılabilir; EBV pozitif BL hücreleri post-germinal B hücre farklılaşmasını normal bir şekilde takip ederler fakat fenotip, gen ekspresyonu gibi durumlarda normal farklılaşma sürecine uymamaktadırlar. Kanıya göre EBV negatif BL hücreleri erken sentroblastlardan, EBV pozitif BL hücreleri ise post-germinal merkez B hücreleri veya hafıza B hücrelerinden köken almaktadır (Leucci, Onnis et al. 2010). Burada da direkt olarak B hücre farklılaşma süreci ve burada görev alan düzenleyici alan gen ve proteinler aklımıza gelmektedir. B hücre farklılaşma süreci birçok aşamadan oluşan, karmaşık bir süreçtir. B hücre farklılaşma süreci BCL-6'nın kapanması ile desteklenir. Bu olay sayesinde *BLIMP1* aktif hale gelir ve BCL-6'yı bastırmaktadır (Schmidlin, Diehl et al. 2009). Bu süreçte yeni bir görüş ortaya çıkmıştır. Burada post-transkripsiyonel eleman olan miRNA'ların gen ekspresyonunu düzenlemesi muhtemeldir. Yapılan bir çalışma miRNA ekspresyonunu EBV pozitif ve EBV negatif hücrelerde değerlendirmiş ve farklılıkları rapor etmiştir (Leucci, Onnis et al. 2010).

2.3.MiRNA Tarihçesi ve Biyogenezi

MicroRNA'lar post-transkripsiyonel aşamada mRNA'yı hedef alarak gen ifadesini düzenleyen endojen kökenli regülatörlerdir. Olgun miRNA'lar tek zincirlidir ve ~22 nükleotitten oluşur. mRNA'yı hedef alan miRNA'lar, mRNA'nın bozulmasına ya da gen ifadesinin baskılanmasına neden olurlar. İlk olarak 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'da rapor edilen miRNA'ların 2001 yılına kadar fonksiyonları tam olarak anlaşılamamıştır (Lin and Gregory, 2015). Keşfedilme süreçleri Victor Ambros ve meslektaşları Rosalind Lee ve Rhonda Feinbaum'un, *C. Elegans* larva gelişiminin zamanlamasını kontrol ettiği bilinen bir gen olan *lin-4*'ün bir proteini kodlamadığını, bunun yerine bir çift küçük RNA ürettiğini anlamaları ile başlamıştır. Bu iki RNA'nın biri uzun diğeri kısa olmasının fark edilmesi ile uzun olanın kısa olana öncülük ettiği düşünülmüştür. Sonrasında *lin-4* RNA'larının *lin-14* geninin 3'UTR'sindeki çoklu bölgelere tamamlayıcı olması ve bu kısmında gen ekspresyon baskılama bölgesi için öngörülen 3'UTR bölgesine denk gelmesi düşündürmüştür. Bu araştırma 1993 yılında yapılan çalışmalara öncülük etmiştir. Ayrıca daha kısa olan *lin-4*, miRNA'ların kurucu üyesi olarak kabul edilmiştir (Bartel 2004). Bitki, mantar, virüs, hayvan ve tek hücreli ökaryotlarda olmak üzere çok farklı türlerde ekspresyonu

düzenlediği bilinmektedir. Kapsamlı miRNA verilerini bize sunan miRBase 223 farklı türden yaklaşık olarak 30.000 miRNA girişi bulunmaktadır (Afonso-Grunz and Müller 2015).

mRNA biyogenezi bir dizi aşamayı ve farklı kompleksleri içerir. MiRNA gen ekspresyonu çekirdekte genellikle RNA Polimeraz II tarafından transkripte edilir ve pri-miRNA şapkalı, poli-adenillenmiş halde olabilir. MiRNA'ların %30'luk bir kısmı intronlardan kodlanırken, çoğu miRNA ise, özel miRNA gen bölgelerinden tanımlanır (Lin and Gregory 2015). En başta ortaya çıkan gen pri-miRNA'dır ve bazı aşamalar sonucu olgun miRNA ortaya çıkar (Ha and Kim 2014).



Şekil 2.9. miRNA Biyogenezi (Winter, Jung et al. 2009).

MiRNA biyogenezi, çekirdekte ve sitoplazmada sırasıyla gerçekleşen ve süreci katalizleyen iki RNA polimeraz III (DICER ve DROSHA'nın)'ün dahil olduğu bir süreci ifade eder. MiRNA çekirdekte DROSHA, sitoplazmada ise DICER tarafından işlenmektedir (Bartel 2004). Nükleusta ise pri-mirna oluşuktan sonra burada mikroişlemciler (DROSHA ve DGCR8) tarafından bölünür (Denli, Tops et al. 2004). pri miRNA saç tokası yapısında olup 1 kb dan daha uzun bir yapıdadır (Ha and Kim 2014). Burada DROSHA iki RNAase III enzimi barındırır ve bu RNAase III

enzimlerinin ikisi de 60-70 nükleolitik saç tokası şeklindeki öncü miRNA'yı serbest bırakırlar. Burada oluşturulan miRNA 'pre-miRNA'dır. Kesilen dsRNA yaklaşık olarak 11 baz çiftlik komşu ssRNA ile birleşir ve bu birleşim 3' ucunda 2 nükleotid içeriyorsa tip 1 miRNA, eğer 1 nükleotid içeriyorsa tip2 miRNA oluşmaktadır (Lin and Gregory 2015). Oluşan pre-miRNA XPO5 tarafından nükleustan sitoplazmaya taşınmaktadır. Burada RNAase III enzimi olan DICER miRNA'yı işlemeye devam edecektir. DICER'in transaktivasyon-cevap RNA bağlanma proteini olan TRBP (TARBP2 tarafından kodlanır) ile ilişkide olduğu bilinmektedir. TRBP, DICER ve Argonaute arasında da iletişim kurulmasına yardımcı olur (Davis-Dusenbery and Hata 2010). DICER, burada pre-miRNA'nın 3' ve 5' uç kısımlarına bağlanarak iki katalitik RNAase III domain alanı oluşturur. Bu sayede Dicer işlev gösterebilmektedir. Asimetrik olarak buralardan kesilen pre-miRNA yaklaşık 22 nükleotidlik olgun miRNA'ya dönüşmektedir (Ha and Kim 2014, Lin and Gregory 2015).

Argonat (AGO) proteinlerinin miRNA olgunlaşma yolağında DICER gibi yadsınamaz bir rolü vardır. Burada argonat, DICER ve arada iletişim kuran TRBP ile oluşan miRISC kompleksi oluşur (Michlewski and Cáceres 2019). Argonatların hem DICER işlevini katalizlediği hem de olgun miRNA'nın yüklenmesini sağladığı bilinmektedir. Her miRNA AGO aktivitesine ihtiyaç duymamaktadır. Burada dicer kesimi sonucu oluşan miRNA çift zincirlidir (Lin and Gregory 2015). Bir iplik kılavuz görevi görürken diğer iplik bozular ve kaybolur. Kılavuz görevi gören asıl iplik AGO yüklenilecek ipliklidir. Burada AGO ve miRISC kompleksi sayesinde miRNA hedef mRNA'yı kofaktör olarak kullanarak 3'UTR bölgesine bağlanır ve mRNA'yı susturur veya degrade eder. Kompleksin tam anlamıyla bağlanabilmesi susturmaya sebep olurken, tam olarak bağlanamaması degradasyona sebep olmaktadır (Pasquinelli 2012).

2.3.1. miRNA Fonksiyonu ve Kanserdeki Rolü

MiRNA'lar, mRNA'nın 3'UTR veya 3'ORF bölgesine komplementer olarak bağlanarak işlev gösterirler. Bu bağlanma için miRNA'nın 5' ucunda konumlanmış tohum adı verilen diziler temel oluştururlar. MiRISC kompleksi içindeki olgun mRNA'nın 3'UTR veya 3'ORF bölgesine bu tohum dizisine kısmen tamamlayıcı Watson-Crick baz eşleşmesi ile bağlanır. Bu bağlanma genellikle kusurludur (Afonso-Grunz and Müller, 2015). Bu bağlanma sayesinde mRNA'nın yıkılmasına ya da gen ifadesinin baskılanmasına neden olmaktadır. MiRNA'nın mRNA'ya kusursuz ve

tam bağlanma gerçekleştirmesi mRNA'nın yıkılmasına neden olurken, kusurlu ve tam olmayan bağlanma translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır (Karagün, Antmen et al. 2014). MiRNA bu yönüyle hücre farklılaşması, apoptoz, hücre döngüsü gibi kritik süreçlerde rol almaktadır (Reddy 2015). Bu nedenle keşfinden bu yana üzerine yoğunlaşılan bir konu olmuştur. Tek bir miRNA birden fazla mRNA'nın gen ifadesini baskılayabilir. Aynı zamanda tek bir mRNA birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilmektedir. Bu da tek bir miRNA'nın bile birden fazla yolda rol alabileceğini göstermektedir (Pillai, 2005). Bu nedenle miRNA'ların kesin hedeflerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

MiRNA'lar, gelişme, hücre farklılaşması ve proliferasyonu ile kanserin başlaması ve ilerlemesinde bağışıklık tepkilerinde yer alan genlerin ekspresyonunu modüle eden önemli transkripsiyon sonrası elemanlardır (Piedade and Azevedo-Pereira 2016). Apoptozda ve hücre farklılaşması süreçlerinde etkin rol aldıkları bilinen miRNA'ların kanserle ilişkili olduğu da açıktır (Sirotkin, Lauková et al. 2010). MiRNA'ların kanserle olan ilk ilişkisine dair kanıt 2001 yılında Kronik Lenfositik Lösemili hastalarda yapılan çalışmalar sayesinde ortaya konmuştur. Burada 13q14 lokusunda homozigot kromozomal delesyonu miR-15 ve miR-16'nin ekspresyonunda azalmaya sebep olmuştur. Bu çalışma ile birlikte tümör ve miRNA ekspresyon ilişkisi üzerine çalışmalar arttı ve yeni teknikler ortaya çıktı (Visone and Croce 2009). MiRNA'ların bu yollarda farklı boyutlarda rol aldığı da bu şekilde ortaya çıkmıştır. MiRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı olarak gen ifadesini düzenlemektedirler, tümörigenezde rol oynayabilmektedirler (Sevli et al. 2010; Calin et al. 2002). Bu sayede kanserle olan ilişkileri hem pozitif hem de negatif olabilmektedir.

MiRNA regülasyonunun bozuk olması ayrıca bir tanı olarak kullanılabilir. Aşağı veya yukarı regüle edilen miRNA'lar birçok tümör ile ilişkilendirilmiştir. Nedensel olarak yollarda kanıt bulunmasa da düzensiz regülasyonları tümörle ilişkilendirilmeleri için temel oluşturmaktadır (Reddy 2015). Kanser hücre hatlarında miRNA'nın aşırı ifade edilmesi ya da tam tersi olarak miRNA ifadesinin ortadan kaldırılması gibi yapılan fonksiyonel çalışmalar ile kanser ve miRNA arasındaki bağlantı kanıtlanmıştır. MiR-17-92 onkogenik gen kümesinin aşırı ifade edildiği durumlarda lenfo-proliferatif bozukluğa yol açtığı ve hatta bu gen kümesinin aşırı ifadesinin MYC bağımlı B hücreli lenfomada tümörigenez arttırdığı gösterilmiştir. MiR-21'in aşırı ifade edilmesinin malign lenfoidi indüklediği

bilinmektedir. (Reddy 2015) miR-155 ise kolon, akciğer, pankreas, tiroid, beyin ve meme tümörleri ve daha farklı tümörlerde onkogenik olarak tanımlanmıştır. miR-155 aşırı ekspresyonu aynı zamanda Hodgkin, Burkitt lenfoma gibi çeşitli lenfoma türleri ile de ilişkilendirilmiştir (Visone and Croce 2009).

MiRNA'lar kanserde birer biyobelirteç olarak kullanılmalarının yanı sıra hastalığın ilerlemesinde etki gösterirler. Burada kötü prognozla ilişkilendirilen miRNA'ların varlığı hastalığın seviyesi hakkında bilgi verebilmektedirler. Terapötik olarak hedeflendirilebilen miRNA'lar tedavide de etkin rol alabilmektedirler (Huang 2017). Yolaklarda birden fazla noktada yer alan ve birçok gen üzerinde etkili olabilen miRNA'lar ilaç hedeflerini temsil etmektedirler. MiRNA ifadesinin baskılanması veya indüklenmesi yolakları düzenleyerek tedavi aracı kabul edilmektedirler. MiRNA inhibitörleri veya mimikleri tedavi için umut vericidir. MiRNA ve hedef bölgesi hakkında bilgi sahibi olmak hastalığın tanı ve tedavisi için önemlidir (Farazi, Hoell et al. 2013).

2.3.2. EBV Pozitif Burkitt Lenfomada MiRNA'nın Rolü

Araştırılan tüm Herpes virüsler genomunda miRNA geni taşırlar (Klinke, Feederle et al. 2014). EBV, miRNA kodlayan ilk virüs olarak kaynaklara geçmiştir. BART ve BHRF1 olmak üzere iki ayrı bölgeden en az 44 miRNA kodladığı bilinmektedir. EBV miRNA'ları EBV-pozitif BL hücre hattında yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiş. Bir EBV miRNA profillemesi yapılmıştır (Klinke, Feederle et al. 2014). EBV enfeksiyonu, aynı zamanda konakçının miRNA paternini değiştirir. Bunu yapmak için kendi miRNA'larının ifade olmasını sağlar ya da var olan miRNA ifadesini bozar (Ayoubian, Ludwig et al. 2019).

MiRNA'ların virüs ile ilişkisi açık bir şekilde ortaya konmuştur. Virüsün enfekte olması ile viral miRNA'ların varlığı, aynı zamanda da hücrel miRNA'ların yolaklarda etkili olduğu bilinmektedir (Mrazek, Kreutmayer et al. 2007). EBV pozitif ve EBV negatif BL hücrelerinin kökenlerinin farklı olabileceği görüşünden söz edilmişti (2.2.3). Burada özellikle ekspresyon seviyelerinin düzenlenmesi ve farklı bir farklılaşma süreci söz konusu olduğu için miRNA'ların büyük bir rolü olduğunu düşünmek yanlış olmaz.

İnsan miRNA'ları hücrel bağlamda gen ekspresyonunu düzenleyerek benzersiz bir miRNA imzası oluşturmaktadırlar (Cameron, Fewell et al. 2008) B

lenfosit popülasyonları farklı seviyelerdeki miRNA ifadeleri ile ayırt edilebilir. MiR-7, miR-9 ve miR-155 aktif B hücrelerinde yukarı regüle edilmektedirler, hafıza B hücrelerinde ise miR-224 yukarı regüle edilirken miR-181 aşağı regüle edilmektedir (Lawrie, Saunders et al. 2008). Bu miRNA ifade seviyeleri ayırt edici olmaktadır. MiR-155 aynı şekilde çok sayıda B hücreli lenfoma tipinde yüksek seviyede ifade edilmektedir. MiRNA'ların biyobelirteç olarak kullanıldığında dair çok sayıda örnek vardır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, miR-155 ifadesi ile EBV latensi III periodu arasında bir-korelasyon vardır. MiR-155 ifadesini EBV latensi gen ekspresyonu indüklemektedir. Aynı zamanda LMP-1 ile miR-146 arasında da bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Cameron, Fewell et al. 2008). Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada EBV pozitif ve EBV negatif BL hücrelerinde transkriptom çalışması yapılmış ve kodlanmayan RNA araştırması yapılmıştır. EBV pozitif ve EBV negatif BL hücreleri arasında farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar gözlenmiştir (Mrazek, Kreutmayer et al. 2007).

Burkitt lenfoma vakalarında, esas olarak EBV ilişkisi açısından farklılık gösteren miRNA ekspresyonu üzerine yapılan bir ön çalışmada, bu iki durum arasında farklı bir miRNA imzası tanımlanmıştır. EBV-pozitif BL'de B hücresi farklılaşmasının, hsa-miR-127'nin değiştirilmiş ifadesi ile transkripsiyon sonrası seviyede bozulduğu gösterilmiştir. EBV pozitif Burkitt lenfoma örneklerinde anlamlı derecede yüksek ekspresyon gösteren miR-127, EBV negatif Burkitt lenfoma örneklerinde kontrole yakın ekspresyon göstermiştir. EBNA1 hücrel miRNA hsa-miR-127'nin ekspresyonunu indüklemiş ve EBV ile enfekte olmuş bellek B hücrelerinde B hücresi farklılaşmasını bozmuştur (Onnis, Navari et al. 2012). Sonuç olarak miRNA'lar EBV-pozitif ve EBV-negatif arasında farklı seviyelerde ifade göstererek EBV pozitif ve EBV negatif BL hücreleri arasındaki farkı yaratıyor olabilir.

2.3.3. Çalışmaya Dahil Edilen MiRNA'lar

2.3.3.1. MiR-182-5p

MiR-182 kromozomun 7q32.2 bölgesinde lokalize haldedir. MiR-182 bir onkogenik miRNA'dır (Yang, Ma et al. 2012) Yapılan miRNA ekspresyon çalışmaları miRNA ifadesinin sıklıkla anormal şekilde ifade edildiğini göstermiş ve birçok tümörle ilişkilendirilmiştir. Bu malignitelerin içinde yumurtalık kanseri (Vaksman, Stavnes et al. 2011) prostat kanseri (Yin, Li et al. 2010), pediatrik akut lösemi (Hu, Qi

et al. 2019), akciğer (Sun, Fang et al. 2010) ve meme kanseri (Guttilla and White 2009) vardır. Bu şekilde, birçok hastalıkla ilişkilendirilmesine rağmen lenfoblastik maligniteler ile ilişkisi belirsizliğini korumaktadır. Yapılan bir çalışmada miR-182'nin lenfoblastik malignitelerde FOXO3A inhibisyonu ile hücre sağkalımını indüklediği rapor edilmiştir (Segura, Hanniford et al. 2009). Yapılan bir başka çalışmada birincil merkezi sinir sistemi lenfomasında miR-182'nin negatif etkili olduğu rapor edilmiştir (Takashima, Kawaguchi et al. 2019). Li ve ark (2016) çalışmasında miR-182 yukarı regüle olurken BCL-2 aşağı regüle olmuş ve yine ters yönde bir korelasyon göstermişlerdir (Li, Ma et al. 2016). Tüm bu verilere baktığımızda miR-182'nin lenfoblastik malignitelerle ilişkili olduğu görülmektedir. Ters yönde ve negatif bir etkiye sahiptir. EBV pozitif hücre hatlarında yapılan bir çalışma LMP-1'in miR-182'nin ifadesini baskıladığı ekspresyon analiz yöntemleri ile rapor etmiştir. Latensi III'te, latensi I'e kıyasla daha düşük seviyede ifade edildiği de belirtilmiştir (Delecluse and Pfeffer 2015). Bu nedenle miR-182'nin EBV ve BL arasında görev alması şaşırtıcı olmaz. Aynı zamanda miR-182 veri tabanı sonuçlarına göre *BLIMP1*'i hedeflemektedir. Böylece B hücre farklılaşma sürecinde de rol alıyor olabilir.

2.3.3.2. MiR-320a

MiR-320 ailesi, miR-320a (8), miR-320b (chr1), miR-320d (chr13 ve chrX), miR-320c (chr18) ve miR-320e'den (chr19) oluşur. MiRNA-320 ailesi insan sağlığı, hastalıkları ve kanser ile yakından ilişkilendirilmiştir (McCreight, Schneider et al. 2017) MiR-320 kodlanma bölgesi, RNA polimeraz III'ün spesifik bir korunmuş alt birimi olan hücre döngüsü geni RNA polimeraz III alt birimi D'nin (*POLR3D*) yukarı akış bölgesidir (Kim, Sætrom et al. 2008). Özellikle metastaz ve invazyon ile ilişkili önemli genleri hedef alan bir miRNA olarak tanımlanmıştır (Yao, Liang et al. 2012, Wan, Deng et al. 2015). EMT baskılayıcı, apoptozu indükleyen beş üyeden oluşan miR-320a ailesinin kanser tanı ve prognoz tahmininde potansiyel biyobelirteç olduğu söylenebilir (Liang, Li et al. 2021).

MiR-320a, insan kromozomu 8p21.3 lokalize olarak bulunur. Hastalık progresyonu, tümör invazyonu ve metastazı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Prostat (Okato, Goto et al. 2016), kolon (Sun, Huang et al. 2012) ve meme kanserinde tümör oluşumunu inhibe edici özelliği ve ploriferasyon baskılayıcı özelliğinden bahsedilmiştir (Yu, Wang et al. 2016). Hsa-miR-320a-3p'nin, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinde PI3K / Akt sinyallemeğini inhibe ederek hücre

göçünü ve invazyonunu baskıladığını göstermiştir (Zhao, Sun et al. 2018). Bu nedenle, anti-tümör olma özelliği taşıyan miR-320a biyobelirteç ve tedavi yaklaşımı için bir seçenek olma potansiyeli yüksektir.

DLBCL hücrelerinde ER stresini etkileyerek hücre sağkalımını ve kemoterapiye cevabı etkilediği görülmüştür. Aynı zamanda B hücre farklılaşmasında düzenleyici olarak görev alan *XBP1*'i hedef aldığı rapor edilmiştir (Cui, Xu et al. 2021). Daha önce Ebola virüsü ile ilişkilendirilmiş ve bu virüsün toksisitesini azalttığı bildirilmiştir. MAPK1 ve PTEN gibi hücre sinyal yollarında önemli rol alan genler miR-320a'nın hedefleri arasındadır. Aynı zamanda MYC de miR-320a tarafından hedeflenmektedir (Zhang, Liu et al. 2018)Yapılan bir çalışmada B-lenfoblast hücre hattında yüksek seviyede ifade edildiği rapor edilmiştir (Zhang, Liu et al. 2018). miRror veri tabanında *BLIMP1*'i de hedeflediği belirlenmiştir ve STarMir web sunucunda hedeflediği bölge tanımlanmıştır (Şekil 3.3). miR-320a daha önce EBV viral yük açısından BL hücrelerinde araştırılmamıştır.

2.3.3.3. MiR-144-5p

MiR-144, birçok kanser türünde önemli hasara maruz kalan kromozomal bölge 17q11.2'de bulunur. Eritroid soyunun hayatta kalması ve olgunlaşması için gerekli eritroid spesifik bir miRNA'dır (Dore, Amigo et al. 2008). Mesane (Matsushita, Seki et al. 2015) ve yumurtalık kanseri (Han, Zhu et al. 2018) gibi birçok kanserde eksprese olduğu ve yollarında önemli hedefleri olduğu bilinmektedir (Zhou, Wu et al. 2020). Biyobelirteç potansiyeli yüksek bir miRNA'dır. Yüksek ekspresyonunun anti-tümör özelliği taşıdığı bilinmektedir (Zhou, Wu et al. 2020). MiR-144, BCL6 ters bir korelasyon içindedir. BCL6'yı hedeflediği bilinmektedir. Bu nedenle lenfoblastik malignetelerle ilişkili içindedir. MiR-144'ün aşırı ekspresyonunun farelerde DLBCL kseno-transplantlarının invazyonunun engellendiği görülmüştür. Potansiyel bir tümör baskılayıcı miRNA olarak bahsedilmektedir (Wang, Wang et al. 2016). Aynı zamanda yapılan bir miRNA ekspresyon profil çalışmasında HL'da anlamlı derecede düşük ekspresyon gösteren miR-144 bu lenfoma için bir biyobelirteç olabilmektedir (Khare, Goldschmidt et al. 2017). miRror veri tabanında yapılan araştırma sonrası miR-144'ün *BLIMP1* ve *XBP1*'i hedeflediğini gördük, STarMir web sunucusunda da hedeflediği bölgeleri tanımladık. miR-144 daha önce bu yönüyle araştırılmamıştır. Diğer çalışmalar nedeniyle biyobelirteç olma olasılığı yüksek olan miRNA'nın *BLIMP1* üzerindeki hedef bölgesi Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

3. MATERYAL-METOT

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmaya, Ocak 2006 ile Mart 2022 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi (OMÜTF) Çocuk Hematoloji-Onkoloji Kliniğine başvurmuş, Patoloji kliniğince BL tanısı almış hastalara ait arşiv materyali olarak saklanan formalin ile fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) tümör dokusu ve çevresindeki sağlıklı doku örneği çalışmaya dahil edildi. Yapılan benzer çalışmalar dikkate alınarak Minitab 16.0 programında 0,05 hata payı ve %90 güç ile hesaplama yapıldı. Analiz sonucuna göre her gruba en az 14 hasta alınması gerektiği hesaplandı. Güç analizine istinaden önerilen bu çalışmaya 14 EBV-pozitif Burkitt lenfoma hastası ve 14 EBV-negatif Burkitt lenfoma hastasına ait toplam 28 parafine gömülü lenf nodu örneğinden alınan kesitler çalışmaya dahil edildi. Hasta gruplarının demografik özelliklerinin benzer olmasına dikkat edildi.

Çalışmanın başında OMÜ Patoloji kliniğinden 48 FFPE BL örneği alındı. Fakat bu 48 örnek içerisinde aynı kişiye ait farklı rumuzlarda örneklerin olduğu farkedildi. Tüm örneklerin lenf nodu olmasını ve aynı kriterleri taşıması istendiğinden aynı kişiye ait olan tüm örnekler çalışmadan çıkarıldı. Güç analizi sonucu elde ettiğimiz 28 örnek ile çalışmaya devam edildi.

3.2. Materyal

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Çocuk Hematoloji-Onkoloji kliniğine başvuruda bulunan hastalardan tanı için Patoloji kliniğince alınan ve arşivlenen BL doku örnekleri çalışmanın materyalidir. Çalışmalardan artan FFPE tümör dokusu ve çevresindeki sağlıklı doku çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma bu yönüyle retrospektif bir çalışmadır. Toplam 28 hastanın her bir FFPE örneğinden 10 mikronluk kesitler alınmış ve tüpe konulmuştur. Çalışma zamanına kadar örnekler -80'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın akış şeması

3.3. Ön Çalışma: İn Siliko MiRNA Analizi

Literatürü incelediğimizde birçok çalışmada B hücreli lenfomalarda miRNA imzası olduğu ve miRNA'ların düzenleyici olarak görev aldığını görmekteyiz. Epstein Barr virüsü ve Burkitt lenfoma arasındaki ilişkiye dair eksik bilgiler dikkat çekmektedir. Onnis ve ark. (2012) çalışmasında, miR-127'nin *EBNA1* varlığında aşırı eksprese olması, *BLIMP1*, *XBP1*'in transkripsiyon sonrası düzenlenmesiyle B hücre farklılaşması sürecine dahil olduğu gösterilmiştir. Buradan yola çıkarak Epstein Barr virüsü pozitif Burkitt lenfomada *EBNA1* varlığında ekspresyonları değişen ve sürece dahil olan başka miRNA'ların olduğunu düşündük. MiRror veri tabanında B lenfosit farklılaşma süreci ana düzenleyicileri olan *BLIMP1* *XBP1*'i hedefleyen miRNA'ları belirledik. Üç miRNA için de literatür taraması yaptık ve seçtiğimiz miRNA'ların (miR-182, miR320a, miR-144) B hücreli lenfomada ifade edildiği ve ilişkili olduğunu gördük. Daha sonra STarMir veri tabanında seçilen miRNA'ların (miR-182, miR-320a, miR-144) hedef bölgelerini tanımladık.

- Tüplere 500 µl ksilen eklendi. Tüpler aşağı ve yukarı sallanarak karıştırıldı.
- Oda sıcaklığından 10 dk inkübe edildikten sonra 3 dk 4°C’de son hızda santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant atıldı.
- Tüplere 250 µl ksilen eklendi ve yine karıştırıldı. Oda sıcaklığında 3 dk inkübasyon sonrası 3 dk son hızda 4°C’de santrifüj yapıldı.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- Tüplere tekrar 250 µl ksilen eklendi. Tüpler karıştırıldı.
- 3 dk inkübasyon sonrası 3 dk 4°C’de son hızda santrifüj yapıldı.
- Oluşan süpernatant atıldı.
- Tüplere 300 µl etanol (%100 etanol) eklendi. 10 sn son devirde vorteks yapıldı.
- 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 3 dk son hızda santrifüj yapıldı.
- Oluşan süpernatant atıldı.
- Tekrar 300 µl etanol eklendi. Vorteks yapıldı. 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 3 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı.
- 25 dk 37°C’de etüvde inkübe edildi.
- Etüvden çıkarılan örnekler steril uç ile havanlara alındılar. Havana eklenen sıvı azot ile tokmak yardımıyla parçalandılar.
- Havanda ezilen örneklerin üzerine 700 µl qiazol eklendi. Pipetaj yapılarak örnekler havandan 1,5’luk tüplere alındılar.
- Tüpe alınan karışım 20 gauçluk iğne ucundan 10 kez geçirildi.
- Oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra 140 µl kloroform ile muamele edildi. Kapağı sıkıca kapatılarak 15 sn tüpler sallandı. 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 15 dk. 12.000 g’de 4°C’de santrifüj yapıldı.
- Kloroform ve santrifüj sonrası tüpte faz ayrımı oluştu. Üstteki faz yeni 1,5’luk tüpe aktarıldı. Orta fazdan kaçınıldı.
- Yeni tüpe alınan üst fazın 1,5 katı kadar (525 µl) %100 etanol tüpe eklendi. Pipetaj yapıldı.
- Tüpteki karışımın 700 µl’si 2 ml’lik kolonlara aktarıldı. 10.000 g’de 15 sn. oda sıcaklığında santrifüj yapıldı.
- Akış sonrası altta kalan flow-through atıldı.

- Kolona 700 µl RWT eklendi. 10.000 g’de 15 sn santrifüj yapıp flow-through atıldı.
- 500 µl RPE kolonun ortasına eklendi. 15 sn 10.000 g’de santrifüj yapıldı. Flow-through atıldı.
- Tekrar 500 ml RPE kolona eklendi. 2 dk 10.000 g’de santrifüj yapıldı.
- Kolon 2 ml’lik tüplere aktarıldı. 1 dk son hızda santrifüj yapıldı.
- Kolon 1,5’luk tüplere aktarıldı. 50 µl RNaz içermeyen su filtrenin tam ortasına bırakıldı. 1 dk 10.000 g’de santrifüj yapıldı. RNA’yı yoğunlaştırmak amaçlı bu işlem tekrar edildi. 1,5’luk tüplere yaklaşık 50 µl hacmindeki RNA aktarıldı.

Elde edilen RNA’nın konsantrasyon miktarı ve kalite tayini Multiskan GO spektrofotometre (Thermo Scientific, NH, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.1. cDNA Çevrimi

RNA izolasyonundan sonra ABM miRNA All-In-One cDNA Synthesis Kit (Bio Basic)’i ile RNA, cDNA’ya RT-PCR ile çevrildi. Kitin protokolüne uygun hacimlerde (Tablo 3.1) reaksiyon hazırlandı.

Tablo 3.1. cDNA PCR Reaksiyonu

Bileşen	Reaksiyondaki hacmi
Super karışım	5 µl
Enzim karışımı	1 µl
RNA template	4 µl
Total hacim	10 µl

Reaksiyon hassas bir şekilde verilen hacimlere göre hazırlandıktan sonra kısa spin yapıldı. Oluşturulan karışım GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazında RT programı dahilinde Tablo 3.2’ de gösterilen sıcaklıklara belirtilen sürelerde maruz bırakıldı.

Tablo 3.2. cDNA çevrim PCR koşulları

RT-PCR	Sıcaklık (°C)	Süre
1.adım	37°C	30 dk
2.adım	50°C	15 dk
3.adım	85°C	5 dk

Örnekler son adımdan sonra buza alındı. Real-Time PCR deneyleri öncesi elde edilen cDNA örneklerinin miktarlarını ve kalitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Kalite ve miktar tayini Multiskan GO spektrofotometre (Thermo Scientific, NH, USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.4. Real-Time PCR ile EBV Tespiti

Burkitt lenfoma örneklerinde EBV pozitif ve EBV negatif ayrımı yapabilmek için Real-Time PCR yapıldı. EBV genomunun BamH1-W fragman bölgesine doğru gerçek zamanlı bir kantitatif PCR sistemi kullanılarak ölçüldü. Real-Time PCR, PCR reaksiyonunun gerçek zamanlı olarak izlendiği, amplifikasyonla orantılı sinyal veren floresans sayesinde de kantitatif sonuç veren bir yöntemdir (Bustin 2005).

EBV'nin tespit edildiği altın standart yöntemlerde (EBER *in situ*) sonucun negatif olmasına rağmen EBV'nin immüno-histokimyasal testlere dayanarak varlığını göstermesi nedeniyle tutarsızlık oluşmuştur. Bu yöntemi seçmemizin sebebi Ryan ve arkadaşlarını yaptığı çalışmaya göre, BamH1W segmentini hedefleyen Q-PCR testi, lenfoma veya enfeksiyöz mononükleozlu dokuz hastanın tümünde EBV'nin ölçülebilir olduğu, ancak dokuz sağlıklı kontrolün tümünde EBV'nin saptanamadığı örneklerde bilgilendirici olmuştur. Bulgular, q-PCR'nin parafine gömülü dokuda ve plazma örneklerinde EBV virüsünü ayırt etmede etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir (Ryan et al. 2004). EBV genomunda BamHI-W segmenti korunmuştur. BamH1W testi, hedef dizinin her viral genomda tekrarlandığı gerçeğine uygun olarak, düşük seviyeli virüsü tespit etmek için diğer segmentlere göre en hassas olanı olarak

belirtilmiştir (Ryan, Fan et al. 2004). ApoB hücresel proteini ise (insan kontrol geni) örnekler arasında normalizasyon sağlamak için kullanılmıştır (Rajesh, Dickerson et al. 2011). Burada BamH1-W kopya sayısı / ApoB kopya sayısı viral yük olarak kabul edilmiştir (Ryan, Fan et al. 2004). Böylece cDNA elde sürecine kadar olan süreç elimine edilmiştir (Rajesh, Dickerson et al. 2011). EBV ifade tespiti ve nicel analizi için hazırlanan ön karışımda BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (ABM, Richmond, BC, Canada) kullanıldı, Real-Time PCR prensipleri ve ayrıntılı reaksiyon kurulum prosedürlerine göre gerçekleştirildi. Tüm cDNA'lar ayrıca, kontrol görevi gören β -globin geni için qPCR analizine tabi tutuldu. Hem EBV hem de β -globin PCR'ler çift olarak gerçekleştirildi (Lei et al. 2000).

Tablo 3.3. RT-PCR Reaksiyon

Bileşen	Hacim
BlasTaq™ 2X qPCR MM	5 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Template DNA	1 μ l
Nükleaz içermeyen su	3 μ l
Total hacim	10 μl

Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazına kitin belirttiği çalışma koşulları girilerek PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3.4. RT-PCR koşulları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	95°C	3 dk	50 döngü
Denatürasyon	95°C	15 sn	
Bağlanma	60°C	1 dk	
Erime eğrisi	Cihaz prensiplerine göre		

3.5. Real-Time PCR ile MiRNA Ekspresyon Analizi

miRNA ifade analizleri için qPCR yöntemi uygulandı ve bu amaç için Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazı kullanıldı. MiRNA ekspresyon analizi BrightGreen miRNA qPCR MasterMix (ABM, Richmond, BC, Canada) kullanıldı.

Çalışmadaki üç farklı miRNA'nın (miR-182, miR-320a ve miR-144) ekspresyonları bu miRNA'lara özgün dizayn edilmiş ekspresyon primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. İnternal kontrol olarak, miRNA ifade analizi için zorunlu yaşam geni (housekeeping) *SNORD48* geni ve bu gene özgü primer olarak Hs_SNORD48_1_SG QuantiTect Primer Assay (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanıldı.

Tablo 3.5. RT-PCR reaksiyon

Bileşen	Hacim
BlasTaq™ 2X qPCR MM	5 µl
Forward Primer (10 µM)	0,3 µl
Reverse Primer (10 µM)	0,3 µl
cDNA	1 µl

Nükleaz içermeyen su	3,4 µl
----------------------	--------

Total hacim	10 µl
--------------------	--------------

Kitin belirttiği oranlarda karışım hazırlanacaktır ve Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) cihazına bu kitin protokolünde belirtilen çalışma koşulları girilerek qPCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.6. RT-PCR koşulları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dk	50 döngü
Denatürasyon	95°C	10 sn	
Bağlanma	63°C	15 sn	
Uzama	72°C	20sn	
Erime eğrisi	Cihaz prensiplerine göre		

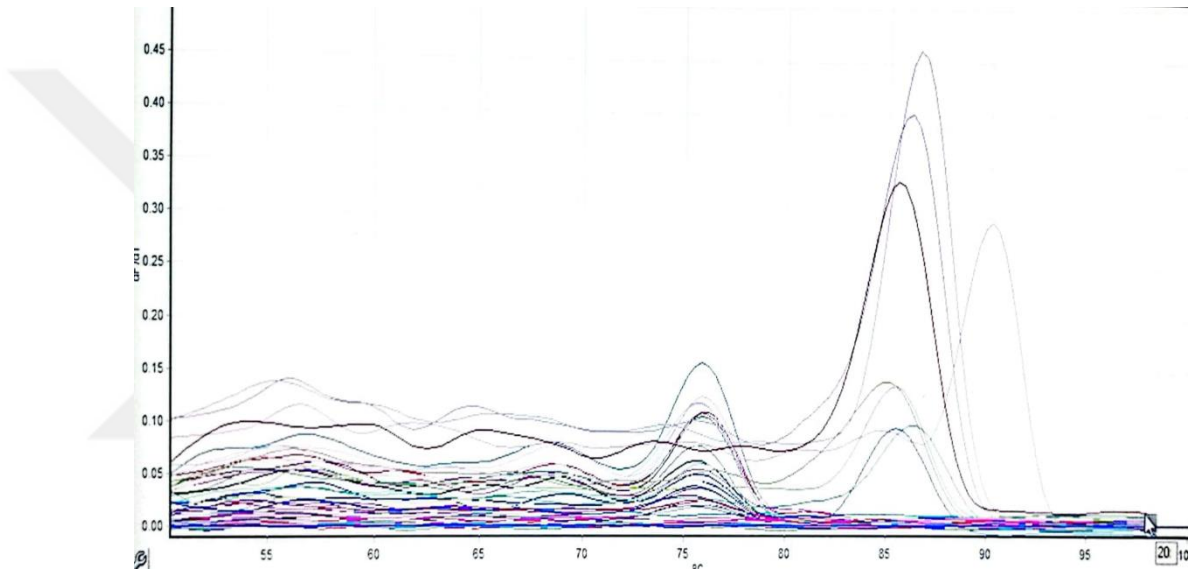
Biz kullanıma hazır, çalıştığı kanıtlanmış miRNA primerleri ile çalışmayı planladık. Ayrıca, kullandığımız Real Time PCR master miksi optimize koşulları datasheet'te belirttiği için direk olarak bu koşulları uyguladık. Bu optimize koşulları uygulamamıza rağmen, tez projesi kapsamında TÜBİTAK 1002 Hızlı destek programı kapsamında desteklenen projemizde de ifade ettiğimiz gibi karşılaştığımız sorunlara karşı bazı B planları uyguladık.

Ct değeri alınamayan ve yukarıdaki koşullarda 3 tekrarlı q-PCR'ı gerçekleştirilen miR-144 ve miR-182 için;

- Bağlanma 30 saniyeye çıkartıldı ve bağlanma sıcaklığı 55°C'ye düşürüldü.
- Sonrasında ise 1 µl yerine 3 µl cDNA eklenerek reaksiyon tekrarlandı.

- Geç ct veren örnekler için ise cDNA 3 µl olacak şekilde reaksiyon tekrarlandı.

MiR-320a ifade analizi sürecinde de bazı sorunlarla karşılaştık. Yine, TÜBİTAK 1002 Hızlı destek programı kapsamında desteklenen projemizde de ifade ettiğimiz gibi karşılaştığımız sorunlara karşı bazı B planları uyguladık. Örneğin, bazı örneklerin melting curve analizinde çift peak gördük. (Ki bu uygulamayı agaroz jelde yürütmeye göre spesifik olmayan bir ürün veya primer dimerinin çoğalmasının daha hassas bir analizi olarak kullandık.) Bu durumdaki örneklerde aynı şartlarda tekrar yürütme yapıldığında tek peak görüldü ve sorun çözüldü.



Şekil.3.5. Non-spesifik ürün çoğalmasını gösteren Real-Time PCR grafiği

3.6. İstatistiksel Analiz

SPSS 21 programı (IBM software, Pointe Claire, Quebec, Kanada) ifade düzeyleri ölçülecek olan miRNA'ların istatistiki analizinde kullanıldı. İstatistiki analiz olarak, ikili karşılaştırmalarda Spearman korelasyon analizi ile gerçekleştirildi. $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapıldı. Kısmi miktarlara dayalı yöntemde ifade ölçümü yapılacak miRNA'ların ölçüm değerleri *SNORD48* ile normalize edildi. Referans olarak alınan *SNORD48* belirli şartlar altında ifade düzeyi değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden ifade edilen housekeeping genlerdir. QRT-PCR yönteminde Ct (Cp, Crossing points) değerleri elde edildi. EBV pozitif ve EBV negatif Burkitt lenfoma örnekleri kıyaslandı. Bahsi geçen grupların dokularından

elde edilen Ct değerleri kullanarak ilgili miRNA ifade düzeyleri istatistiksel olarak kıyaslandı. Kıyaslama için $2^{-\Delta C_t}$ formülü uygulanmıştır.



4.BULGULAR

4.1. Hasta Verileri

Çalışmamıza Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Çocuk Hematoloji-Onkoloji servisinden BL tanısı alan ve patoloji kliniğinde arşiv materyali olarak saklanan biyopsi örnekleri dahil edilmiştir. 28 hastanın %67,85'i erkek, %35,15'i ise kadındır. Örneklerin alındığı 28 hastanın yaş ortalaması $9,1 \pm 3,9$ (min:2-max:17) yıldır.

Tablo 4.1. Demografik bilgiler

		Hasta (n=28)
Cinsiyet (%)	Erkek	67,85
	Kadın	35,15
Yaş ortalaması (Yıl)		9,1

Örneklerde yapılan immünohistokimya analizlerinden bazı veriler Tablo 4.5'de bulunmaktadır. Analizlerde bakılan bazı antijenler ve proteinler pozitif veya negatif olarak değerlendirilmiştir. Elimizdeki verilere göre bcl2 10 kişide %90 negatif, bcl6 12 kişide %100 pozitif, cd10'nun 14 kişide %16,6'sı negatifken %83,4'ü pozitif, cd20'in 17 kişiden %6,25 negatif, %93,75'i pozitif ve c-myc 8 kişide %100 pozitif olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak bakıldığında da antijenler ve proteinlerin pozitif/negatiflikleri arasında çok anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$).

Her hastanın tüm klinik verilerinin olmamasıyla beraber çoğunlukta görülen bazı parametreler aşağıda bulunmaktadır.

Tablo 4.2. İmmünohistokimya analiz verileri

	Bcl2	Bcl6	Cd10	Cd20	c-MYC
Pozitif	1(%10)	12(100,0)	12(%85,7)	16(%94,1)	8(100,0)
Negatif	9(%90)	-	2(%14,3)	1(%5,9)	-

Verisi olan hasta sayısı	10	12	14	17	8
--------------------------------	----	----	----	----	---

Çalışmanın ilk basamağı olan in siliko kısımda B lenfosit oluşum yolağının iki önemli bileşeni olan *BLIMP1* ve *XBP*'i hedeflediğini gördüğümüz ayrıca literatürde lenfoma ve türleri ile ilişkilendirilen 3 miRNA (miR-182 ,miR-144, miR-320a) seçildi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji kliniğinde Burkitt lenfoma olarak tanımlanmış hastalar tespit edildi. Bu hastalardan 28 tanesinin parafine gömülü doku örnekleri çalışmaya dahil edildi.

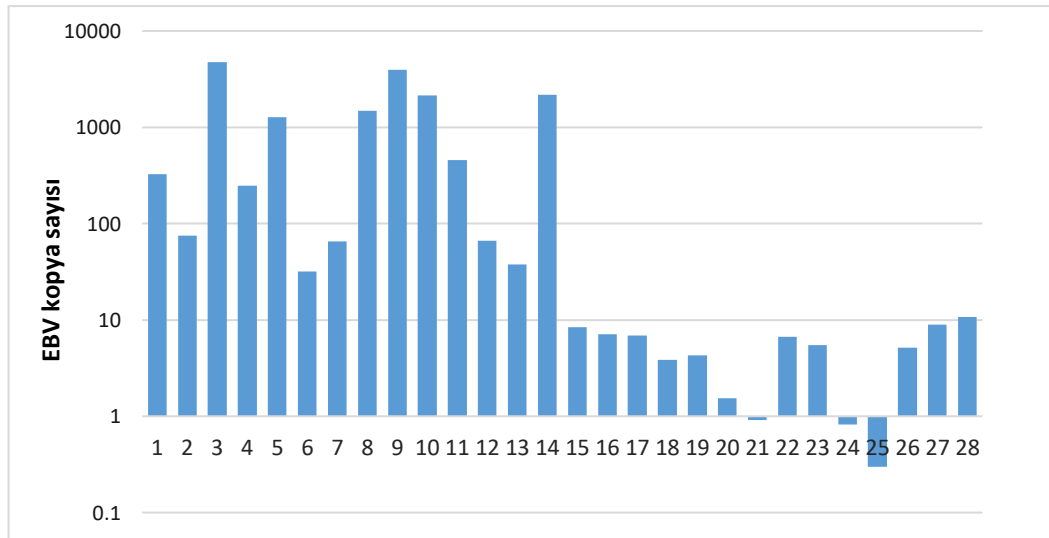
4.2. EBV Kopya Sayısı Tespiti ve EBV Pozitif-Negatif Ayrımı

RNA izolasyonu ve cDNA çevriminde sonraki aşama ise alınan örneklerin EBV kopya sayılarını belirleyerek burada EBV pozitif ve negatif olmak üzere iki grup belirlenmesiydi. Alınan örneklerden ApoB ve BamHI-W fragman bölgesine yapılan Real time PCR sonuçları, Ct değerleri değerlendirildi. Örneklerin Ct değerleri karşılaştırıldı ve EBV kopya sayısına göre iki ayrı grup oluşturuldu. ApoB/BamHI-W oranı bize EBV kopya sayısını verdi (Tablo 4.3). Burada pozitif örnekler arasında en düşük EBV kopya sayısının, negatif örnekler içerisindeki en yüksek EBV kopya sayısı değerinden en az 3 kat fazla olduğunu söylemek mümkün. EBV kopya sayısı değişimi Şekil 4.1.'de de net şekilde görülmektedir.

Tablo 4.3. Kantitatif PCR sonuçları

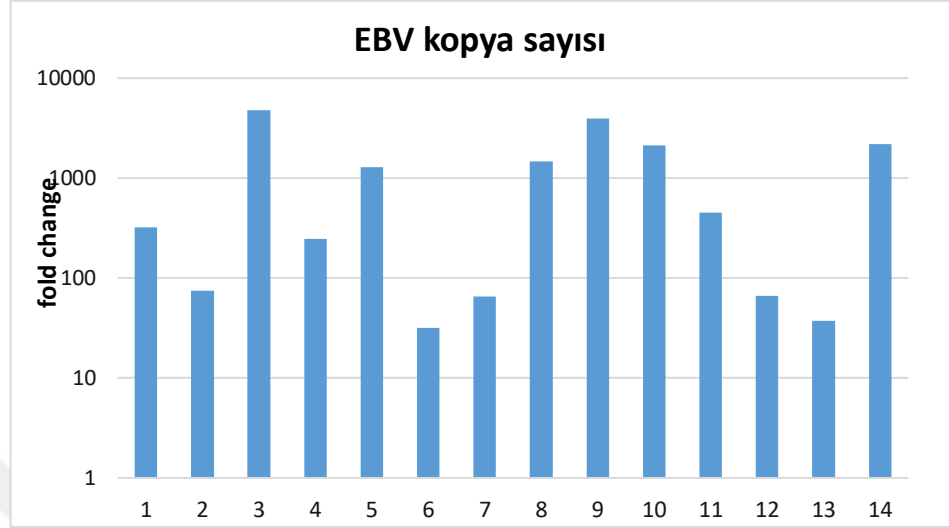
Örnek numarası	BamH1-W/ApoB kopya sayısı oranı	Örnek numarası	BamH1-W/ApoB kopya sayısı oranı
1	324,03	15	8,46
2	74,54	16	7,06
3	4770,75	17	6,91
4	247,27	18	3,83

5	1278,29	19	4,287094
6	31,77	20	1,54
7	65,34	21	0,91
8	1478,58	22	6,68
9	3929,14	23	5,46
10	2134,97	24	0,82
11	455,08	25	0,29
12	66,25	26	5,16
13	37,53	27	9,00
14	2179,83	28	10,70

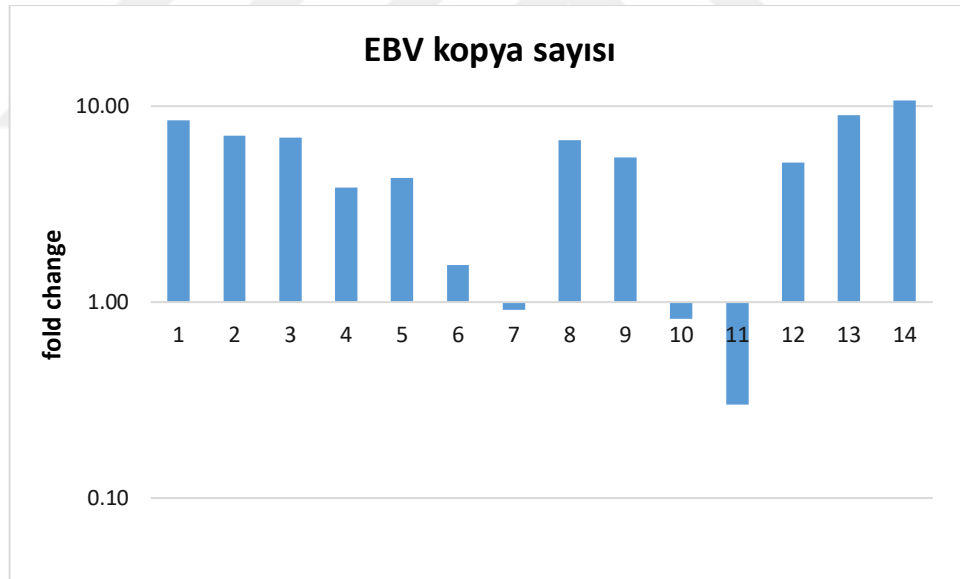


Şekil 4.1. Tüm örneklerde EBV kopya sayısı grafiği (ilk 14 örnek pozitif BL örnekleri olarak değerlendirilirken, 14-28 negatif BL örnekleri olarak değerlendirilmiştir.)

Gruplar içinde EBV kopya sayısına dair farklılıklar mevcuttur. Viral yük olarak değerlendirdiğimiz EBV kopya sayısı her grup içerisinde değişkenlik göstermektedir (Şekil 4.1.)



Şekil 4.2. EBV-pozitif örneklerde EBV kopya sayısı grafiği

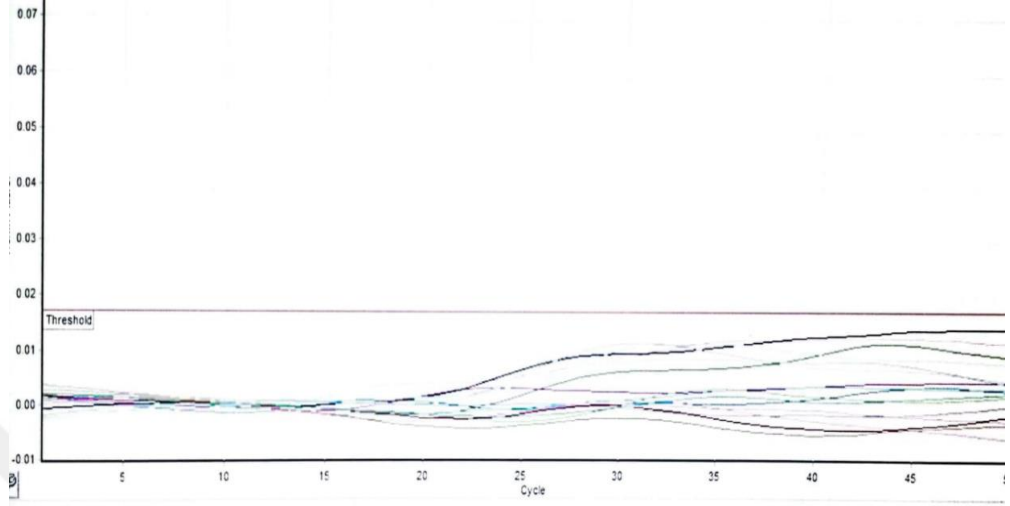


Şekil 4.3. EBV-negatif örneklerde EBV kopya sayısı grafiği

4.3. MiRNA İfade Değişimleri

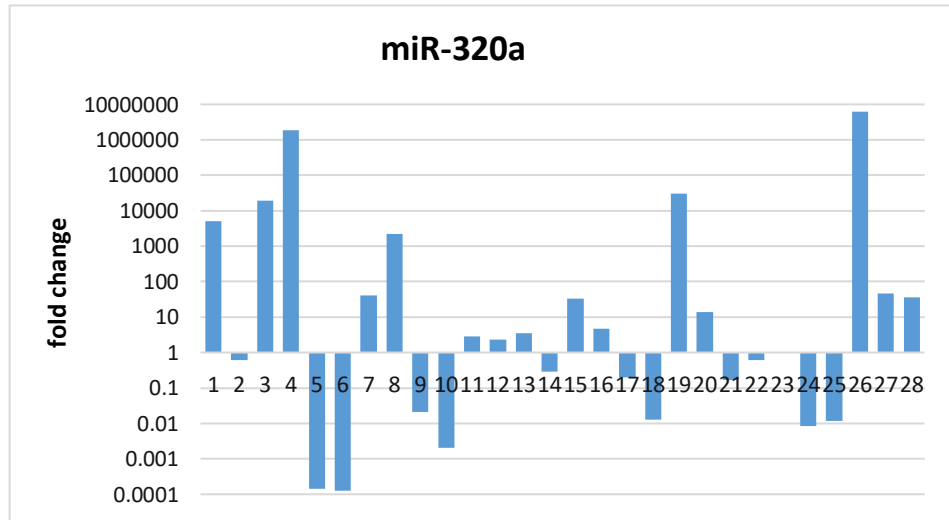
EBV kopya sayı değişimlerine göre belirlenen bu iki grupta seçilen üç miRNA'nın (miR-182, miR-144, miR-320a) Real time PCR ile ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Yapılan Real-time PCR analizlerinde 28 örneğin 6'sında miR-144 ve 4 örnekte miR-182 ifadesi gözlemlendi. Fakat diğer örneklerde miR-144 ve miR-182

ifadesi gözlenmedi. İstatistiksel olarak bu veriler değerlendirmeye alınmadı. Hibridizasyon süresi uzatılmasına ve sıcaklığın düşürülmesine rağmen örneklerde ct elde edilemedi. cDNA konsantrasyonunun artması da bu miRNA’larda (miR-182, miR-144) Ct değeri almamıza yardımcı olmadı.

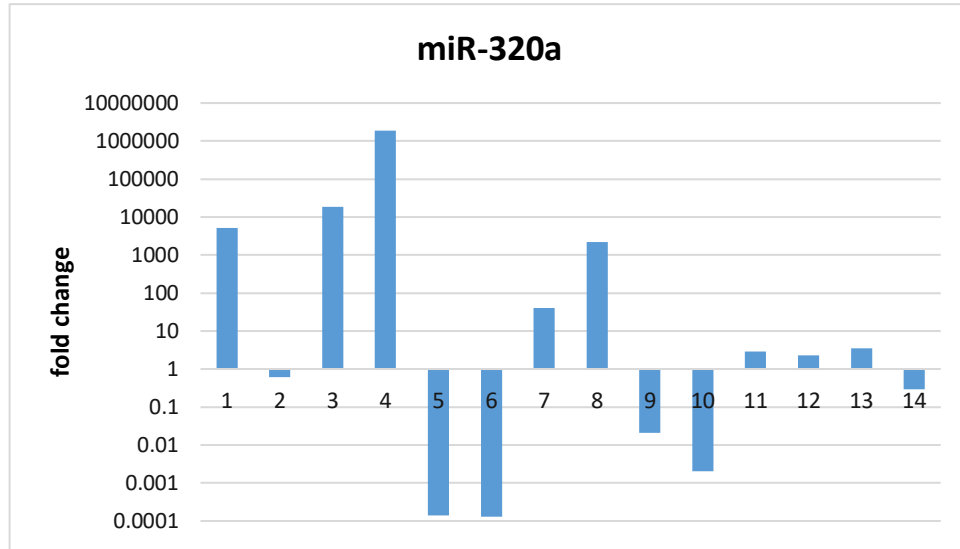


Şekil.4.4. MiR-182 Real-Time PCR sonucu alınan cycle grafiği

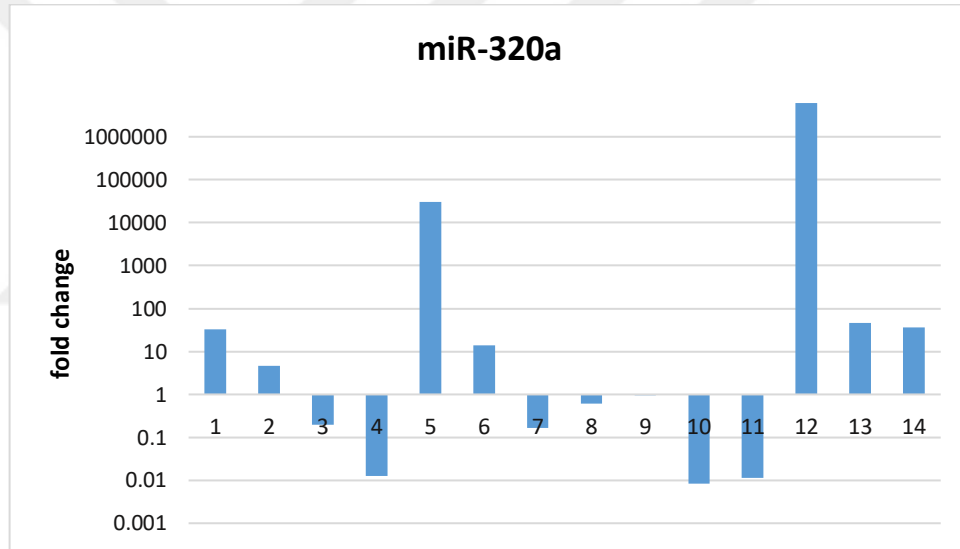
MiR-320a çalışmaya dahil olan 28 örnekte tümünde eksprese olmuştur. Bu nedenle miR-320a ifade değişimi tüm örneklerde analiz edilmiştir. MiR-320a ekspresyon değişimi analize dahil edilmiştir (Şekil 4.5). EBV-pozitif (Şekil.4.6), EBV-negatif (Şekil 4.7.) olmak üzere iki ayrı grupta da incelenmiştir. İstatistiksel analiz neticesinde EBV-pozitif ve EBV-negatif grupta miR-320a ekspresyon seviyelerinin ortanca değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı($p>0,05$).



Şekil 4.5. 28 örnekte (EBV pozitif+EBV negatif) miR-320a ifade değişim grafiği



Şekil 4.6. EBV-pozitif örneklerde miR-320a ekspresyon grafiği



Şekil 4.7. EBV-negatif örneklerde miR-320a ekspresyon grafiği

MiR-320a ifade değişimi istatistiksel olarak da değerlendirildi. SPSS-Spearman korelasyon testi ile tüm örneklerde EBV kopya sayısı ve miR-320a ifade değişimi arasında korelasyona bakıldı. Fakat bir korelasyon bulunmadı (Tablo 4.5).

Tablo 4.4. 28 BL örneğinde miR-320a ifade korelasyon analizi

miR-320a

Spearman's rho	B/A	Correlation Coefficient	0,094
		Sig. (2-tailed)	0,634
		N	28

EBV-pozitif olarak değerlendirilen grupta miR-320a ekspresyonu arasında korelasyon analizi yapıldı. Fakat EBV-pozitif grup ile miR-320a ekspresyonu arasında bir korelasyon gözlenmedi (Tablo 4.6)

Tablo 4.5. EBV-pozitif grup ile miR-320a korelasyon analizi

		miR-320a	
Spearman's rho	EBV- pozitif	Correlation Coefficient	0,029
		Sig. (2-tailed)	0,923
		N	14

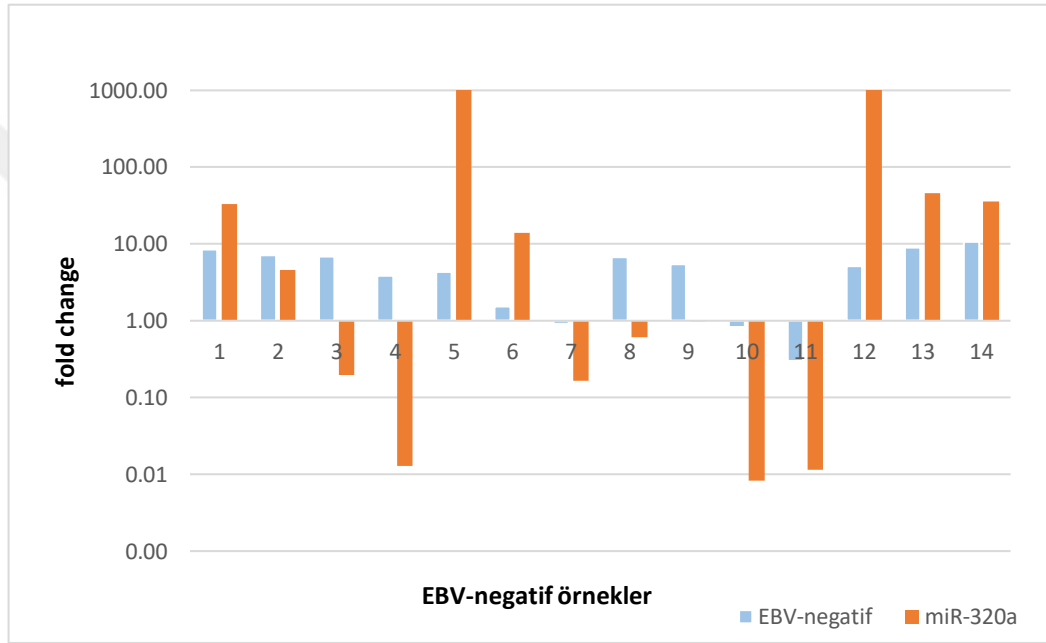
EBV-negatif grup ve miR-320a ifadesi arasında yapılan korelasyon analizi ise anlamlı bulundu. EBV-negatif örneklerdeki EBV kopya sayısı ile miR-320a ifade değişimi arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($p<0,05$) (Tablo 4.7)

Tablo 4.6. EBV-negatif grup ile miR-320a ifade korelasyon analizi

Spearman's rho	EBV-negatif	miR-320a	
		Correlation Coefficient	0,587*

Sig. (2-tailed)	0,027
N	14

EBV-negatif örnekler ile miR-320a ifade değişimi arasındaki ilişki pozitif yönlü olup EBV kopya sayısı ile miR-320a ekspresyon değişim grafiğinde net şekilde de gözlenebilmektedir (Şekil 4.8)



Şekil 4.8. EBV-negatif örneklerde miR-320a ifade değişim grafiği

5.TARTIŞMA

Burkitt lenfoma kromozomal translokasyon taşıyan, EBV virüsü ile ilişkili bir patogeneze sahip hızlı ilerleyen agresif büyük B hücreli non-hodgkin lenfomadır (López, Burkhardt et al. 2022). Hem bir translokasyonla (Zech, Haglund et al. 1976) hem de bir virüs ile ilişkilendirilen ilk tümör olma özelliğini taşımaktadır (Epstein 1964). Dünya sağlık örgütü tarafından sporadik, endemik ve immün yetersizlikle ilişkili BL olmak üzere üç alt tip BL tanımlanmıştır (Swerdlow, Campo et al. 2016). Non-Hodgkin lenfomaların %1 ila %5'ini oluşturan BL (Linch 2012) özellikle Afrika ve Yeni Papua Gine'de oldukça yaygındır (Dozzo, Carobolante et al. 2016). Özellikle MYC translokasyonu (Dalla-Favera, Bregni et al. 1982), EBV, HIV (Serraino, Salamina et al. 1992), sıtma gibi kofaktörler patogenezinde rol alır (Torgbor, Awuah et al. 2014). BL patogenezinde bir çok yolağın rol aldığını, birçok genin burada rol aldığını görmekteyiz (Schmitz, Young et al. 2012). Bu karmaşık süreç sonunda agresif BL ile sonuçlanmaktadır.

EBV, özellikle B lenfositlerinde gizli enfeksiyon sürdürebilen, uzun süre kalıcılığını koruyan Herpes virüs ailesine ait bir virüstür (Ruf, Rhyne et al. 1999). Oral yolla taşınım sağlayan EBV, asemptomik enfeksiyona sebep olmaktadır. EBV, lenfositleri ve epitel hücreleri hedef alır(Thorley-Lawson 2005). Litik ve latent enfeksiyona sebep olan EBV'nin BL'de germinal merkez hücreleri merkezli enfeksiyon gerçekleştirdiği bilinmektedir (Pattle and Farrell 2006). Tüm insanların %95'i EBV tarafından enfekte durumdadır. İlk olarak Burkitt lenfoma hücre hattında keşfedilen EBV, birçok tümör ile de ilişkilendirilmiştir. Endemik BL'nin %95'i, sporadik BL'nin %10'u ve immün yetersizlik ilişkili BL'nin ise %30'u EBV pozitifdir (Pattle and Farrell 2006). EBV ile BL arasındaki ilişki bariz fakat belirsizliğini korumaktadır. Burada yolağın netleşmesi terapötik hedeflendirme ve yeni tedavi yaklaşımları için oldukça önemlidir. Üstüne çok fazla araştırma yapılmasına rağmen EBV ve Burkitt lenfoma arasındaki ilişkiye dair hala eksikler vardır. Bu ilişkide rol adlığı düşünülen, yüksek potansiyelli grup ise miRNA'lardır (Leucci, Onnis et al. 2010). MiRNA'lar 20-25 nükleotid uzunluğunda post-transkripsiyonel aşamada görev alarak gen ifadesini etkileyen elemanlardır. MiRNA'lar tümörijeniz, hücre farklılaşması gibi süreçlerde rol aldığı bilinen, zaman geçtikçe birçok süreçte etkinliği ortaya çıkan önemli elementlerdir (He and Hannon 2004).

EBV miRNA kodladığı bilinen ilk tümör olma özelliği taşır. Viral BART ve BHRF1 segmentinden türetilen 25 öncülden toplamda 44 miRNA kodlanır. Kendi miRNA ekspresyonu sayesinde hücrel miRNA ifadesini, profilini bozarak enfeksiyonunu devam ettirmektedir (Ayoubian, Ludwig et al. 2019). EBV enfeksiyonunun varlığında yüksek ya da düşük ekspresyon gösteren bazı miRNA'lar tanımlanmıştır. B hücreli lenfomada EBV varlığında miR-155'in indüklenmiş ekspresyonu B hücre ölümsüzleşmesine neden olduğu gösterilmiştir (Linnstaedt, Gottwein et al. 2010). Bu konuyla ilgili miRNA profillemesi çalışmaları yapılmıştır. Linnstaedt ve ark.'nın 2010 daki profil çalışması sonucunda EBV-pozitif DLBC'de miR-221, has-miR-424, -223, -199a-3p, -199a-5p, -27b, -378, -26b, -23a, -23b'ün yukarı regüle olduğu, has-miR-155, -20b, -221, -151-3p, -222, -29b / c, -106a ise aşağı regüle olduğu gösterilmiştir (Linnstaedt, Gottwein et al. 2010). Cameron ve ark.'nın 2008 yılında yaptığı bir çalışmada ise EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücre hatlarında yapılan miRNA profillemesi çalışması yapılmıştır. Burada EBV'nin latensi programlarında ayrı ayrı miRNA'ların farklı seviyelerde eksprese olduğu gösterilmiştir. EBV latensi III'te pri-miR-34a'nın daha yüksek eksprese olduğu bildirilmiştir. Pri-miR-21'in de aynı seviyede yüksek olduğu gösterilmiştir. Olgun miRNA işleme sürecinde kusur olabileceği de belirtilmiştir (Cameron, Fewell et al. 2008).

EBV-pozitif ve EBV-negatif hücre hatlarında miRNA ifade değişimi barizken aynı şekilde yapılan çalışmalar sonucunda EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücre hatlarında da farklı miRNA'ların farklı seviyelerde eksprese olduğu ortadadır. Bu ekspresyon seviyesindeki değişimler yolakları etkilemekte ve BL'de olumlu ya da olumsuz sonuçlar çıkarmaktadır. MiRNA'nın yüksek ya da düşük ekspresyon olması yolakta görevli genlerin ifadesini etkilemekte ve BL prognozu değişmektedir. Onnis ve ark. (2012) çalışmalarında EBV-pozitif BL'de hsa-miR-127'nin EBNA-1 varlığında aşırı eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Bu yüksek ekspresyon sayesinde BLIMP-1 ve XBP-1'in ekspresyonunun baskılanmasına ve tümör küçülmesine neden olduğu da raporlanmıştır (Onnis, Navari et al. 2012). Çalışmamız bu çalışmadan temel almıştır. B hücreli lenfomalar ile ilişkili ya da olabilecek miRNA'lar literatürde belirlenmiştir. Belirlenen miRNA'ların özellikle BLIMP-1 ve XBP-1'i hedefleme durumu incelenmiştir. Çünkü B lenfosit oluşum yolağında regülatör olarak görev alan BLIMP-1 ve XBP-1 yolağın sonunda önemli rol almaktadırlar. Bu genlerin

ekspresyonunun baskılanması B lenfosit oluşum yolağını sonlandıracak ve tümör hücrelerinin oluşumu önemli ölçüde azalacaktır. Bu nedenle amacımız hsa-miR-127 gibi EBV-pozitif ve EBV-negatif gruplar arasında anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren, aynı zamanda da *BLIMP1*, *XBP1* gibi genleri hedefleyerek bize sonraki çalışmalar ve terapötik hedeflendirme için fikir verebilecek miRNA'ları tespit etmektir. Yapılan literatür araştırması sonrası in-siliko çalışmalar yapılmıştır. MiRroR veri tabanı ve StaRmiR'de belirlenen miRNA'ların *BLIMP1* ve *XBP1* hedef bölgeleri belirlenmiştir. StaRmiR veri tabanı sonuçları alınmış ve çalışmanın temeli oluşturulmuştur. Çalışmamızda, Burkitt lenfoma tanısı almış 28 hastanın parafine gömülü lenf nodu örneği ile çalıştık. Tablo 4.2'de hastaların patoloji raporlarından aldığımız bazı değerler mevcuttur. Burada cd10, cd20, Bcl6, cmyc pozitifken, Bcl2 negatiftir. Her hastanın tüm bilgileri olmamakla beraber mevcut verileri taşıyan hastaların literatürdeki BL profiline uygun olduğunu söyleyebiliriz (Hummel, Bentink et al. 2006, Montes-Moreno, Roncador et al. 2008).

EBV viral DNA'sındaki BamH1-W tekrar bölgesine ve ApoB'ye özgü yapılan Real-Time PCR sonuçlarına göre BamH1-W/ApoB kopya sayısı oranı ile viral yük tespit edilmiştir. Viral yük oranına göre örnekler EBV-pozitif ve EBV- negatif olarak iki ayrı gruba ayrılmıştır. Seçilen miRNA'ların (miR-144, miR-182, miR-320a) ifade analizleri Real-Time PCR ile gerçekleştirildi. Ct değerleri değerlendirildi ve gruplar arasında miRNA ekspresyon seviyelerine bakıldı. MiR-144 ve miR-182 ekspresyonu gözlenmedi. Bu nedenle miR-144 ve miR-182 istatistiksel analiz aşamasında değerlendirilmedi.

MiR-182-5p'in BL'deki rolü daha önce net şekilde belirtilmemiştir ve EBV-pozitif ve EBV-negatif BL hücrelerinde de değerlendirilmemiştir. Fakat Oussaief ve ark. (2015) çalışmasında EBV kodlu LMP-1'in miR-183-96-182 kümesinin ifadesini bastırdığı bildirilmiştir. Bu ekspresyon düşüklüğü tabi latensi I'de LMP-1'in varlığından dolayı oldu. Aynı zamanda miR-182 hedefi olan *RAS* onko gen ailesi üyesi *KRAS*'ın yüksek ekspresyonu gözlenmiştir(Oussaief, Fendri et al. 2015). Bu durum değerlendirildiğinde miR-182 ekspresyonu indüklendiğinde ve dış etkenler baskılandığında aslında tümör baskılayıcı görev alması muhtemeldir. Fakat miR-182 ekspresyonu örneklerde tespit edilemedi. Bunun sebebi miRNA işlenme sürecinde bazı hataların olması olabilir. Transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel aşamada miR-182 oluşumunda farklılıklar ve yapısal değişiklikler meydana gelmiş olabilir. Bu

nedenle BL’de miR-182 ifadesi gözlenmiyor olabilir. Pri-miR-182 bazında değerlendirildiğinde miRNA oluşum yolağında mı bir sorun oldu bu öğrenilebilir. Gen ifade regülasyon sürecinde yaşanan farklılıklar BL’ye özgü miR-182 ifadesini down-regüle etmiş de olabilir. Ve bu ekspresyon tespit edilemedi. aynı zamanda Leucci ve ark (2008) çalışmasında *MYC* translokasyonunun miRNA deregülasyonu üzerinde etkisi olabileceğinden bahsedilmiştir (Leucci et al. 2008). *MYC* translokasyonu ile karakterize olan BL’de miR-182 ve miR-144 ifadesi bu durumdan etkilenmiş olabilirler.

MiR-182-5p gibi miR-144 ifadesi de tespit edilemedi. MiR-144 *BCL-6*’yı hedeflediği için B hücreli lenfomalar ile doğrudan ilişkilidir. Tümör baskılayıcı olarak yollarda etkin rol alan miR-144-5p’nin B-NHL’de de işlev gördüğü bilinmektedir(Fuertes, Ramiro et al. 2020). Gen lokusunun duplekasyonu ise c-myc aktivasyonu ve B-lenfomageneze katkıda bulunduğu da rapor edilmiştir(Fuertes, Ramiro et al. 2020). Ekspresyon tespit edemememizin sebepleri miR-182-5p ile aynı olabilir. Gen regülasyon basamaklarında meydana gelen farklılıklar ve olgun miRNA’nın oluşma yolağında da beklenmedik etkenler rol almış olabilir. MiR-144-5p ifadesi lenfo-proliferatif tümörlerde beklenen bir durum normalde. Olmaması durumu hücrel miRNA’ların birbirini baskılaması ile de ortaya çıkabilir. Süreçte rol alan başka miRNA ve genler miR-144-5p ekspresyonunu engellemiş olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda da ekspresyon alınamayan veya çok düşük ekspresyon gösteren miRNA’lardan bahsedilmiştir (Kluiver et al. 2007). Bu durumun viral enfeksiyonun periodu ve buradaki protein ekspresyonu ile ilişkili olabileceğinden bahsedilmiştir (Kluiver et al. 2007). Bu ekspresyon eksikliği miRNA hedef genlerin ekspresyon artışına ve BL patogeneze katkıda bulunuyor olabilir.

Fraga ve ark (2008)’ de Real-Time PCR üzerine yaptıkları yayında RNA’nın miktar ve kalitesinden ve dolayısıyla elde edilen cDNA’nın öneminden bahsetmişlerdir. Çalışmanın başında elde edilen RNA konsantrasyonu yüksek olmamakla beraber cDNA eldesi de tam kaliteli ve yüksek verimlilikte gerçekleşmemiştir. Baştan RNA izolasyonu mümkün olmadığı için çalışmaya elde edilen RNA ile devam edilmiştir. Real-Time PCR protokolü ile ilgili vurdukları bir kısım da primer dizaynı (Fraga et al. 2008)Yaşadığımız sorunlar üzerine kısa bir PCR ürünü sağlayacak şekilde yeni bir primer çifti dizayn edip, bu primerlerle tekrar deneyebiliriz. Fakat bunu için süremiz de ek bütçemizde yoktu. Örneğin, proje

bünyesindeki primer çiftlerimizin gelmesi 4 ay sürdü. Bu nedenle yeni bir primer dizaynı ile miRNA ekspresyon analizi yeniden analiz edilebilir.

MiR-320a ise tüm örneklerde eksprese olmuştur. 28 örnekte EBV viral kopya sayısı ile miR-320a ifadesinin Spearman korelasyon analizi sonucunda herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (Tablo 4.4). EBV pozitif ve negatif olarak gruplar içerisinde de viral kopya sayısı ile miR-320a ekspresyonunun korelasyon analizi yapılmıştır. Burada EBV pozitif grupta viral yük ile miR-320a ekspresyonu arasında korelasyon bulunmazken (Tablo 4.5), EBV negatif örnekler ile miR-320a ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Tablo 4.6). Daha önce bu yönüyle araştırılmamış olan miR-320a ifadesinin anlamlı çıkması önemli bir veridir. *MYC*'i hedefleyen miR-320a'nın Zhang ve ark. (2018) çalışmasında B hücreli lenfoma hücre hatlarında yüksek ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (Zhang, Liu et al. 2018). *MYC*'i hedeflemesi nedeniyle BL ile de ilişkili olması beklenerek çalışmaya dahil edilmiştir. 28 örnekte korelasyon gözlenmemesi durumu daha fazla örnekte optimizasyon ile tekrarlanabilir. EBV ile ilişkili olan fakat farklı yolakları da barındıran BL patogenezi birçok genin mutasyonunu taşır. B hücreli lenfoma hücre hattında yüksek ekspresyon gösteren miR-320a'nın BL'de ifadesi baskılanmış ya da EBV kopya sayısı ne kadar düşük olsa da EBV enfeksiyonunun varlığı karakteristik ekspresyon profilini bozmuş olabilir. Fakat EBV-negatif gruptaki EBV kopya sayısı ile miR-320a ekspresyonu pozitif korelasyon göstermiştir. Bu şu şekilde açıklanabilir. EBV- negatif grupta kopya sayısı ile miR-320 a ekspresyonu aynı yönde artıyor. EBV-pozitif grupta ise EBV kopya sayısı yüksek şekilde artarken miR-320a ekspresyonu aynı seviyede kalmakta olabilir ya da bir yere kadar artıp sonra stabil ifade gösteriyor olabilir. Burada EBV'nin artan enfeksiyonu ve eksprese olan genler miR-320a ifadesini baskılıyor olabilir. Bu nedenle miR-320a ekspresyonu aynı zamanda yolakta görev alan genlerin ifadesini baskılanma veya indüklenme durumunda incelenmelidir.

MiR-320a, RAS onkogeni ailesi üyesi *RAB14*, *TRIAP1*, *BNIP3*, *MLF1*, *TUSC3*, *MAP3K9*, *BCL6B*, *MAPK1*, *PTEN*, ve *MYC* gibi genleri hedeflendiği bilinmektedir. Genlerin apoptoz, hücre proliferasyonu gibi önemli yolaklarda görev alması, miR-320a ifadesinin aşağı ya da yukarı eksprese olarak bu yolaklarda düzenleyici olarak rol aldığı fikrini güçlendirmektedir. Çalışmamızda miR-320a'nın *BLIMP1* hedef bölgesi gösterilmiştir. Aynı zamanda *XBP1* 3'UTR bölgesini hedeflediği bilinmektedir. DLBCL hücre hatlarında oldukça yüksek ekspresyon

gösterdiği bildirilen miR-320a'nın B hücre farklılaşma yolağında görev alan *BLIMP1* ve *XBP1*'i hedeflemesi oldukça uyumlu görünmektedir. EBV negatif örneklerde EBV kopya sayısı ve miR-320a ekspresyon seviyesi arasında bulunan pozitif korelasyon ve miR-320a'nın hedef genleri bize EBV ve BL arasındaki ilişkide önemli bir rol aldığını düşündürmektedir. MiR-320a ve EBV arasındaki ilişkiyi anlamak için çalışmamız bir temel oluşturabilir ve EBV-BL yolağında miR-320a hedef genlerinin de ekspresyon seviyeleri incelenerek daha fazla bilgi sahibi olunabilir.

Çalışmamızın kısıtlı yanları ele alındığında ise, çalışma örneklerinin parafine gömülü doku olması nedeniyle RNA ve dolayısıyla cDNA eldesi %100 verimle gerçekleşmemiştir. Serumdan EBV tespiti daha sağlıklı olması söz konusudur. Ancak Real-Time PCR sonuçları bu verimden bağımsız olarak özellikle kontrol gen (β -aktin) ve *SNORD48*'de iyi sonuçlar alınmıştır. Çalışmamızda özellikle kopya sayısına göre örneklerimizi EBV-pozitif ve EBV-negatif olarak iki ayırdığımızda referans hücre hattı eksikliğini görüyoruz. Çalışmada EBV-pozitif ve EBV-negatif olarak ayrılan gruplar tüm örneklerin EBV kopya sayısı kıyaslaması sonucu oluşturulmuştur. Ayrıca ne kadar miRNA ekspresyon analizi yolak için önem taşısa da miRNA ifadesinin düşük veya yüksek olduğu durumlarda yolaklarda etkili olan genlerinde ekspresyonu bir o kadar değerlidir. EBV'nin BL'deki rolünü ve patogeneze katkısını anlamak ve net şekilde tedavi yaklaşımı oluşturmak için birbiri ile bağlantılı veriler olacaktır. Verilerin anlamlı ve genele yayılabiliyor olması için Real-time PCR ile EBV tespiti için bir standart eksikliği de barizdir. Kopya sayısının değişkenliği gibi sebeplerden dolayı viral yük tespitinde standart değerlerin eksikliği RT-PCR ile yapılan analizin başka bir yöntemle de desteklenmesi ihtiyacını doğurmaktadır. Fakat sadece RT-PCR ile EBV tespiti daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem olarak rutinde yapılmalıdır. Bu nedenle EBV tespiti üzerine RT-PCR yaklaşımı geliştirilmelidir.

6.SONUÇLAR

Çalışmamızın çıktıları şu şekildedir;

- İn siliko çalışmalar neticesinde lenfoma ile ilişkilendirilmiş olan miR-320a, miR-144, miR-182'nin hedef bölgeleri tanımlanmıştır. (miR-320a-*BLIMP1*, miR-144-*BLIMP1*, miR-182-*XBPI*).
- Hedef bölgelerinin B lenfosit oluşum yolağında rol alması miRNA'ların BL'de rol alabileceği fikri ile EBV ile olan ilişkisinde ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Bu yönleri ile daha önce araştırılmamış olan miRNA'ların ifadesi gruplar arasında kıyaslandı.
- Çalışmamıza BL tanısı almış 28 hastadan parafine gömülü doku örneği dahil edilmiştir. Yaş ortalaması 9.1 olan hasta grupları içerisinde elimizde verileri olan hastalara göre;
- Bcl2 10 kişide %90 negatif, bcl6 12 kişide %100 pozitif, cd10'nun 14 kişide %16,6'sı negatifken %83,4'ü pozitif, cd20'in 17 kişiden %6,25 negatif,%93,75'i pozitif ve c-myc 8 kişide %100 pozitif olduğu görülmektedir. Bu yönüyle BL profiline uyan hastalar olduğunu görmekteyiz. Tüm hastalara genelleme yapabilir ve BL'nin immünohistokimyasal analizinde olması gerek profil budur.

Çalışmamız sonucunda;

- miR-144 ve miR-182 ekspresyonu gözlenmemiştir.
- Spearman korelasyon analizinde miR-320a ekspresyonu ise EBV-negatif grupta viral yük ile pozitif korelasyon göstermiştir ($p=0.027$).
- EBV-pozitif grupta ise viral kopya sayısı ile miR-320a ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiştir($p>0,05$)
- Verilerin immünohistokimyasal analizler ile değerlendirilmesi ise EBV ve BL ilişkisinde oldukça önemlidir. Elimizde olan veriler hasta profilinin BL ile uyumlu olduğunu gösterse de tüm hastaların aynı değerler ile kıyaslanması daha doğru veri verecektir.

Çalışma sonucundan çıkan önemli nokta ise şudur; BL, birçok kofaktör ve gen ile düzenlenen bir sürece sahiptir. miRNA ifadesi klinik özellikler ve diğer faktörler ile birlikte de değerlendirilmelidir. Eksprese olmayan miRNA'ların neden ekspresyon

göstermediği noktada gen ifade süreci gözden geçirilmelidir. Pri-miRNA ifadesinin değerlendirilmesi bu konuda fikir verebilir bizlere.



KAYNAKLAR

- Afonso-Grunz, F. and S. Müller (2015). "Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity." Cellular and Molecular Life Sciences **72**(16): 3127-3141.
- Allday, M. J. (2009). How does Epstein–Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Ayoubian, H., N. Ludwig, T. Fehlmann, J. Menegatti, L. Gröger, E. Anastasiadou, P. Trivedi, A. Keller, E. Meese and F. A. Grässer (2019). "Epstein-Barr virus infection of cell lines derived from diffuse large B-cell lymphomas alters microRNA loading of the Ago2 complex." Journal of virology **93**(3): e01297-01218.
- Babcock, G. J., D. Hochberg and D. A. Thorley-Lawson (2000). "The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell." Immunity **13**(4): 497-506.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." cell **116**(2): 281-297.
- Bellan, C., S. Lazzi, M. Hummel, N. Palumbo, M. De Santi, T. Amato, J. Nyagol, E. Sabattini, T. Lazure and S. A. Pileri (2005). "Immunoglobulin gene analysis reveals 2 distinct cells of origin for EBV-positive and EBV-negative Burkitt lymphomas." Blood **106**(3): 1031-1036.
- Bishop, P. C., V. K. Rao and W. H. Wilson (2000). "Burkitt's lymphoma: molecular pathogenesis and treatment." Cancer investigation **18**(6): 574-583.
- Brady, G., G. MacArthur and P. Farrell (2008). "Epstein–Barr virus and Burkitt lymphoma." Postgraduate medical journal **84**(993): 372-377.
- Burkitt, D. (1958). "A sarcoma involving the jaws in African children." British journal of surgery **46**(197): 218-223.
- Bustin, S. A. (2005). "Real-time PCR." Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics **10**(1): 117-111.
- Cameron, J. E., C. Fewell, Q. Yin, J. McBride, X. Wang, Z. Lin and E. K. Flemington (2008). "Epstein–Barr virus growth/latency III program alters cellular microRNA expression." Virology **382**(2): 257-266.
- Campo, E. (2012). "New pathogenic mechanisms in Burkitt lymphoma." Nature genetics **44**(12): 1288-1289.
- Cohen, J. I. (2000). "Epstein–Barr virus infection." New England journal of medicine **343**(7): 481-492.
- Crawford, D. H. (2001). "Biology and disease associations of Epstein–Barr virus." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **356**(1408): 461-473.
- Cui, Y., H. Xu, Y. Yang, D. Zhao, Y. Wen, C. Lv, H. Qiu and C. Wang (2021). "The regulation of miR-320a/XBP1 axis through LINC00963 for endoplasmic reticulum stress and autophagy in diffuse large B-cell lymphoma." Cancer Cell International **21**(1): 1-13.
- Dalla-Favera, R., M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo and C. M. Croce (1982). "Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **79**(24): 7824-7827.

- Davis-Dusenbery, B. N. and A. Hata (2010). "Mechanisms of control of microRNA biogenesis." The journal of biochemistry **148**(4): 381-392.
- Delecluse, I. J. and S. Pfeffer (2015). "Modulation of the microRNA cluster miR-183-96-182 expression by the Epstein-Barr 1 virus latent membrane protein 1 2."
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting and G. J. Hannon (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature **432**(7014): 231-235.
- Dore, L. C., J. D. Amigo, C. O. Dos Santos, Z. Zhang, X. Gai, J. W. Tobias, D. Yu, A. M. Klein, C. Dorman and W. Wu (2008). "A GATA-1-regulated microRNA locus essential for erythropoiesis." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(9): 3333-3338.
- Dorfman, R. F. (1965). "Childhood lymphosarcoma in St. Louis, Missouri, clinically and histologically resembling Burkitt's tumor." Cancer **18**(4): 418-430.
- Dozzo, M., F. Carobolante, P. M. Donisi, A. Scattolin, E. Maino, R. Sancetta, P. Viero and R. Bassan (2016). "Burkitt lymphoma in adolescents and young adults: management challenges." Adolescent health, medicine and therapeutics: 11-29.
- Dunleavy, K. (2018). "Approach to the diagnosis and treatment of adult Burkitt's lymphoma." Journal of oncology practice **14**(11): 665-671.
- Dunleavy, K., R. F. Little and W. H. Wilson (2016). "Update on Burkitt lymphoma." Hematology/Oncology Clinics **30**(6): 1333-1343.
- Epstein, M. A. (1964). "Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma." Lancet **1**: 702-703.
- Epstein, M. A. and B. G. Achong (2012). The Epstein-Barr Virus, Springer Science & Business Media.
- Fanidi, A., D. C. Hancock and T. D. Littlewood (1998). "Suppression of c-Myc-induced apoptosis by the Epstein-Barr virus gene product BHRF1." Journal of virology **72**(10): 8392-8395.
- Farazi, T. A., J. I. Hoell, P. Morozov and T. Tuschl (2013). "MicroRNAs in human cancer." MicroRNA cancer regulation: 1-20.
- Farrell, P. J. (2019). "Epstein-Barr virus and cancer." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **14**: 29-53.
- Faulkner, G. C., A. S. Krajewski and D. H. Crawford (2000). "The ins and outs of EBV infection." Trends in microbiology **8**(4): 185-189.
- Ferry, J. A. (2006). "Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis." The oncologist **11**(4): 375-383.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). "Real-time PCR". Current protocols essential laboratory techniques, (1), 10-3.
- Freedman, A. S., J. C. Aster and A. Rosmarin (2020). "Epidemiology, clinical manifestations, pathologic features, and diagnosis of Burkitt lymphoma." Uptodate. Post TW (ed): UpToDate Inc, Waltham, MA.
- Fuertes, T., A. R. Ramiro and V. G. de Yébenes (2020). "miRNA-based therapies in B cell non-Hodgkin lymphoma." Trends in Immunology **41**(10): 932-947.
- Giulino-Roth, L. and E. Cesarman (2013). "Molecular biology of burkitt lymphoma." Burkitt's Lymphoma: 211-226.
- Grömminger, S., J. Mautner and G. W. Bornkamm (2012). "Burkitt lymphoma: the role of Epstein-Barr virus revisited." British journal of haematology **156**(6): 719-729.

- Grywalska, E. and J. Rolinski (2015). Epstein-barr virus-associated lymphomas. Seminars in oncology, Elsevier.
- Guttilla, I. K. and B. A. White (2009). "Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells." Journal of Biological Chemistry **284**(35): 23204-23216.
- Ha, M. and V. N. Kim (2014). "Regulation of microRNA biogenesis." Nature reviews Molecular cell biology **15**(8): 509-524.
- Han, S., J. Zhu and Y. Zhang (2018). "miR-144 potentially suppresses proliferation and migration of ovarian cancer cells by targeting RUNX1." Medical science monitor basic research **24**: 40.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, H. Stein, P. M. Banks, J. K. Chan, M. L. Cleary, G. Delsol, B. Falini and K. Gatter (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." blood **84**(5): 1361-1392.
- He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nature reviews genetics **5**(7): 522-531.
- Henle, G., W. Henle, P. Clifford, V. Diehl, G. W. Kafuko, B. G. Kirya, G. Klein, R. H. Morrow, G. M. Munube and P. Pike (1969). "Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups." Journal of the National Cancer Institute **43**(5): 1147-1157.
- Henle, W., G. Henle and E. T. Lennette (1979). "The Epstein-Barr virus." Scientific American **241**(1): 48-59.
- Hochberg, D., J. M. Middeldorp, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga and D. A. Thorley-Lawson (2004). "Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **101**(1): 239-244.
- Hu, J., H. Qi, W. Zhou, W. Kuai, X. Sun and Z. Hong (2019). "Dysregulation and clinical implication of microRNA-183, microRNA-182 and microRNA-96 in childhood acute myeloid leukemia." Int J Clin Exp Med **12**(5): 5527-5535.
- Huang, W. (2017). "MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics." Bioinformatics in MicroRNA research: 57-67.
- Hummel, M., S. Bentink, H. Berger, W. Klapper, S. Wessendorf, T. F. Barth, H.-W. Bernd, S. B. Cogliatti, J. Dierlamm and A. C. Feller (2006). "A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling." New England Journal of Medicine **354**(23): 2419-2430.
- Jaffe, E. S. (2001). Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Iarc.
- Kalisz, K., F. Alessandrino, R. Beck, D. Smith, E. Kikano, N. H. Ramaiya and S. H. Tirumani (2019). "An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence." Insights into imaging **10**(1): 1-16.
- Kamranvar, S., B. Gruhne, A. Szeles and M. Masucci (2007). "Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma." Oncogene **26**(35): 5115-5123.
- Karagün, B. Ş., B. Antmen and Y. KILINÇ (2014). "Mikro RNA ve kanser." Türk Klinik Biyokimya Dergisi **12**(1): 45-56.
- Kelly, G. L., A. E. Milner, G. S. Baldwin, A. I. Bell and A. B. Rickinson (2006). "Three restricted forms of Epstein-Barr virus latensi counteracting apoptosis in c-myc-

- expressing Burkitt lymphoma cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(40): 14935-14940.
- Kelly, G. L. and A. B. Rickinson (2007). "Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy." ASH Education Program Book **2007**(1): 277-284.
- Khare, D., N. Goldschmidt, A. Bardugo, D. Gur-Wahnon, I. Z. Ben-Dov and B. Avni (2017). "Plasma microRNA profiling: Exploring better biomarkers for lymphoma surveillance." PLoS One **12**(11): e0187722.
- Kim, D. H., P. Sætrom, O. Snøve Jr and J. J. Rossi (2008). "MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(42): 16230-16235.
- Klinke, O., R. Feederle and H.-J. Delecluse (2014). Genetics of Epstein–Barr virus microRNAs. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Kluiver, J., van den Berg, A., de Jong, D., Blokzijl, T., Harms, G., Bouwman, E., ... & Kroesen, B. J. (2007). "Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma". Oncogene, 26(26), 3769-3776.
- Ko, Y.-H. (2015). "EBV and human cancer." Experimental & molecular medicine **47**(1): e130-e130.
- Küppers, R. (2003). "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein–Barr virus." Nature Reviews Immunology **3**(10): 801-812.
- Lawrie, C., N. Saunders, S. Soneji, S. Palazzo, H. Dunlop, C. Cooper, P. Brown, X. Troussard, H. Mossafa and T. Enver (2008). "MicroRNA expression in lymphocyte development and malignancy." Leukemia **22**(7): 1440-1446.
- Leucci, E., Cocco, M., Onnis, A., De Falco, G., Van Cleef, P., Bellan, C., ... & Leoncini, L. (2008). "MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation." The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 216(4), 440-450.
- Leucci, E., A. Onnis, M. Cocco, G. De Falco, F. Imperatore, A. Giuseppina, V. Costanzo, G. Cerino, S. Mannucci and R. Cantisani (2010). "B-cell differentiation in EBV-positive Burkitt lymphoma is impaired at posttranscriptional level by miRNA-altered expression." International journal of cancer **126**(6): 1316-1326.
- Levitskaya, J., M. Coram, V. Levitsky, S. Imreh, P. M. Steigerwald-Mullen, G. Klein, M. G. Kurilla and M. G. Masucci (1995). "Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein–Barr virus nuclear antigen-1." Nature **375**(6533): 685-688.
- Li, M., H. Ma, L. Yang and P. Li (2016). "Mangiferin inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human prostate cancer cells is correlated with downregulation of B-cell lymphoma-2 and upregulation of microRNA-182." Oncology Letters **11**(1): 817-822.
- Li, Q., M. K. Spriggs, S. Kovats, S. M. Turk, M. R. Comeau, B. Nepom and L. M. Hutt-Fletcher (1997). "Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes." Journal of virology **71**(6): 4657-4662.
- Liang, Y., S. Li and L. Tang (2021). "MicroRNA 320, an anti-oncogene target miRNA for cancer therapy." Biomedicines **9**(6): 591.
- Lin, S. and R. I. Gregory (2015). "MicroRNA biogenesis pathways in cancer." Nature reviews cancer **15**(6): 321-333.

- Linch, D. C. (2012). "Burkitt lymphoma in adults." British journal of haematology **156**(6): 693-703.
- Linnstaedt, S. D., E. Gottwein, R. L. Skalsky, M. A. Luftig and B. R. Cullen (2010). "Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus." Journal of virology **84**(22): 11670-11678.
- Lombardi, L., E. W. Newcomb and R. Dalla-Favera (1987). "Pathogenesis of Burkitt lymphoma: expression of an activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human B lymphoblasts." Cell **49**(2): 161-170.
- López, C., B. Burkhardt, J. K. Chan, L. Leoncini, S. M. Mbulaiteye, M. D. Ogwang, J. Orem, R. Rochford, M. Roschewski and R. Siebert (2022). "Burkitt lymphoma." Nature Reviews Disease Primers **8**(1): 78.
- Lu, T. X. and M. E. Rothenberg (2018). "MicroRNA." Journal of allergy and clinical immunology **141**(4): 1202-1207.
- Macswen, K. F. and D. H. Crawford (2003). "Epstein-Barr virus—recent advances." The Lancet infectious diseases **3**(3): 131-140.
- Magrath, I. (1990). "The pathogenesis of Burkitt's lymphoma." Advances in cancer research **55**: 133-270.
- Magrath, I. (2012). "Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma." British journal of haematology **156**(6): 744-756.
- Matsushita, R., N. Seki, T. Chiyomaru, S. Inoguchi, T. Ishihara, Y. Goto, R. Nishikawa, H. Mataka, S. Tatarano and T. Itesako (2015). "Tumour-suppressive microRNA-144-5p directly targets CCNE1/2 as potential prognostic markers in bladder cancer." British journal of cancer **113**(2): 282-289.
- Mawson, A. R. and S. Majumdar (2017). "Malaria, Epstein–Barr virus infection and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma." International journal of cancer **141**(9): 1849-1855.
- McCreight, J. C., S. E. Schneider, D. B. Wilburn and W. J. Swanson (2017). "Evolution of microRNA in primates." PLoS One **12**(6): e0176596.
- Michlewski, G. and J. F. Cáceres (2019). "Post-transcriptional control of miRNA biogenesis." Rna **25**(1): 1-16.
- Miller, C. L., A. L. Burkhardt, J. H. Lee, B. Stealey, R. Longnecker, J. B. Bolen and E. Kieff (1995). "Integral membrane protein 2 of Epstein–barr virus regulates reactivation from latensi through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases." Immunity **2**(2): 155-166.
- Molyneux, E. M., R. Rochford, B. Griffin, R. Newton, G. Jackson, G. Menon, C. J. Harrison, T. Israels and S. Bailey (2012). "Burkitt's lymphoma." The Lancet **379**(9822): 1234-1244.
- Montes-Moreno, S., G. Roncador, L. Maestre, N. Martinez, L. Sanchez-Verde, F. I. Camacho, J. Cannata, J. L. Martinez-Torrecuadrada, Y. Shen and W. C. Chan (2008). "Gcet1 (centerin), a highly restricted marker for a subset of germinal center-derived lymphomas." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **111**(1): 351-358.
- Mrazek, J., S. B. Kreutmayer, F. A. Grässer, N. Polacek and A. Hüttenhofer (2007). "Subtractive hybridization identifies novel differentially expressed ncRNA species in EBV-infected human B cells." Nucleic Acids Research **35**(10): e73.
- Murata, T. and T. Tsurumi (2014). "Switching of EBV cycles between latent and lytic states." Reviews in medical virology **24**(3): 142-153.

- Nelson, M., S. L. Perkins, B. J. Dave, P. F. Coccia, J. A. Bridge, E. R. Lyden, N. A. Heerema, M. A. Lones, L. Harrison and M. S. Cairo (2010). "An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with Burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961." British journal of haematology **148**(4): 600-610.
- O'conor, G. T. and J. Davies (1960). "Malignant Tumors in African Children, with special reference to Malignant Lymphoma." Journal of Pediatrics **56**(4): 526-535.
- Okato, A., Y. Goto, A. Kurozumi, M. Kato, S. Kojima, R. Matsushita, M. Yonemori, K. Miyamoto, T. Ichikawa and N. Seki (2016). "Direct regulation of LAMP1 by tumor-suppressive microRNA-320a in prostate cancer." International Journal of Oncology **49**(1): 111-122.
- Onnis, A., M. Navari, G. Antonicelli, F. Morettini, S. Mannucci, G. De Falco, E. Vigorito and L. Leoncini (2012). "Epstein-Barr nuclear antigen 1 induces expression of the cellular microRNA hsa-miR-127 and impairing B-cell differentiation in EBV-infected memory B cells. New insights into the pathogenesis of Burkitt lymphoma." Blood cancer journal **2**(8): e84-e84.
- Organization, W. H. (1969). "Histopathological definition of Burkitt's tumor." Bull WHO **40**: 601-607.
- Oussaief, L., A. Fendri, B. Chane-Woon-Ming, R. Poirey, H.-J. Delecluse, I. Joab and S. Pfeffer (2015). "Modulation of microRNA cluster miR-183-96-182 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1." Journal of virology **89**(23): 12178-12188.
- Pasquinelli, A. E. (2012). "MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship." Nature Reviews Genetics **13**(4): 271-282.
- Pattle, S. B. and P. J. Farrell (2006). "The role of Epstein-Barr virus in cancer." Expert opinion on biological therapy **6**(11): 1193-1205.
- Pelicci, P.-G., D. Knowles 2nd, I. Magrath and R. Dalla-Favera (1986). "Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma." Proceedings of the National Academy of Sciences **83**(9): 2984-2988.
- Piccaluga, P. P., G. De Falco, M. Kustagi, A. Gazzola, C. Agostinelli, C. Tripodo, E. Leucci, A. Onnis, A. Astolfi and M. R. Sapienza (2011). "Gene expression analysis uncovers similarity and differences among Burkitt lymphoma subtypes." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **117**(13): 3596-3608.
- Piedade, D. and J. M. Azevedo-Pereira (2016). "The role of microRNAs in the pathogenesis of herpesvirus infection." Viruses **8**(6): 156.
- Pillai, R. S. (2005). "MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?" Rna **11**(12): 1753-1761.
- Poirel, H. A., M. R. Ambrosio, P. P. Piccaluga and L. Leoncini (2019). Pathology and Molecular Pathogenesis of Burkitt Lymphoma and Lymphoblastic Lymphoma. Aggressive Lymphomas, Springer: 75-94.
- Rajesh, D., S. J. Dickerson, J. Yu, M. E. Brown, J. A. Thomson and N. J. Seay (2011). "Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **118**(7): 1797-1800.
- Reddy, K. B. (2015). "MicroRNA (miRNA) in cancer." Cancer cell international **15**(1): 1-6.
- Rickinson, A. (1996). "Epstein-barr virus." Fields virology: 2397-2446.

- Roman, E. and A. G. Smith (2011). "Epidemiology of lymphomas." Histopathology **58**(1): 4-14.
- Rowe, M., L. Fitzsimmons and A. I. Bell (2014). "Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma." Chin J Cancer **33**(12): 609-619.
- Rowe, M., D. Rowe, C. D. Gregory, L. S. Young, P. Farrell, H. Rupani and A. Rickinson (1987). "Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells." The EMBO journal **6**(9): 2743-2751.
- Ruf, I. K., P. W. Rhyne, H. Yang, C. M. Borza, L. M. Hutt-Fletcher, J. L. Cleveland and J. T. Sample (1999). "Epstein-barr virus regulates c-MYC, apoptosis, and tumorigenicity in Burkitt lymphoma." Molecular and cellular biology **19**(3): 1651-1660.
- Ryan, J. L., H. Fan, S. L. Glaser, S. A. Schichman, N. Raab-Traub and M. L. Gulley (2004). "Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma." The Journal of Molecular Diagnostics **6**(4): 378-385.
- Saha, A. and E. S. Robertson (2011). "Epstein-Barr Virus–Associated B-cell Lymphomas: Pathogenesis and Clinical OutcomesEBV and B-Cell Lymphomas." Clinical Cancer Research **17**(10): 3056-3063.
- Sander, S., D. P. Calado, L. Srinivasan, K. Köchert, B. Zhang, M. Rosolowski, S. J. Rodig, K. Holzmann, S. Stilgenbauer and R. Siebert (2012). "Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis." Cancer cell **22**(2): 167-179.
- Schmidlin, H., S. A. Diehl and B. Blom (2009). "New insights into the regulation of human B-cell differentiation." Trends in immunology **30**(6): 277-285.
- Segura, M. F., D. Hanniford, S. Menendez, L. Reavie, X. Zou, S. Alvarez-Diaz, J. Zakrzewski, E. Blochin, A. Rose and D. Bogunovic (2009). "Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(6): 1814-1819.
- Serraino, D., G. Salamina, S. Franceschi, D. Dubois, C. La Vecchia, J. Brunet and R. Ancelle-Park (1992). "The epidemiology of AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma in the World Health Organization European Region." British journal of cancer **66**(5): 912-916.
- Shannon-Lowe, C. and A. Rickinson (2019). "The global landscape of EBV-associated tumors." Frontiers in oncology **9**: 713.
- Shimizu, N., A. Tanabe-Tochikura, Y. Kuroiwa and K. Takada (1994). "Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV." Journal of virology **68**(9): 6069-6073.
- Shiramizu, B., F. Barriga, J. Neequaye, A. Jafri, R. Dalla-Favera, A. Neri, M. Guttierrez, P. Levine and I. Magrath (1991). "Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association."
- Sirotkin, A. V., M. Lauková, D. Ovcharenko, P. Brenaut and M. Mlynček (2010). "Identification of microRNAs controlling human ovarian cell proliferation and apoptosis." Journal of cellular physiology **223**(1): 49-56.
- Straus, S. E., J. I. Cohen, G. Tosato and J. Meier (1993). "Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management." Annals of internal medicine **118**(1): 45-58.

- Sun, J.-Y., Y. Huang, J.-P. Li, X. Zhang, L. Wang, Y.-L. Meng, B. Yan, Y.-Q. Bian, J. Zhao and W.-Z. Wang (2012). "MicroRNA-320a suppresses human colon cancer cell proliferation by directly targeting β -catenin." Biochemical and biophysical research communications **420**(4): 787-792.
- Sun, Y., R. Fang, C. Li, L. Li, F. Li, X. Ye and H. Chen (2010). "Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro." Biochemical and biophysical research communications **396**(2): 501-507.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, N. L. Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele and J. Vardiman (2008). World Health Organization classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, Lyon: IARC press.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, S. A. Pileri, N. L. Harris, H. Stein, R. Siebert, R. Advani, M. Ghielmini, G. A. Salles and A. D. Zelenetz (2016). "The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **127**(20): 2375-2390.
- Takashima, Y., A. Kawaguchi, Y. Iwadate, H. Hondoh, J. Fukai, K. Kajiwarra, A. Hayano and R. Yamanaka (2019). "MicroRNA signature constituted of miR-30d, miR-93, and miR-181b is a promising prognostic marker in primary central nervous system lymphoma." PLoS One **14**(1): e0210400.
- Tempera, I. and P. M. Lieberman (2014). Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Thorley-Lawson, D. A. (2005). "EBV the prototypical human tumor virus—just how bad is it?" Journal of allergy and clinical immunology **116**(2): 251-261.
- Torgbor, C., P. Awuah, K. Deitsch, P. Kalantari, K. A. Duca and D. A. Thorley-Lawson (2014). "A multifactorial role for *P. falciparum* malaria in endemic Burkitt's lymphoma pathogenesis." PLoS pathogens **10**(5): e1004170.
- Vaksman, O., H. T. Stavnes, J. Kærn, C. G. Trope, B. Davidson and R. Reich (2011). "miRNA profiling along tumour progression in ovarian carcinoma." Journal of cellular and molecular medicine **15**(7): 1593-1602.
- Van den Bosch, C. (2012). "A role for RNA viruses in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: the need for reappraisal." Advances in hematology **2012**.
- Victoria, G., D. Dominguez-Sola, A. Holmes, S. Deroubaix, R. Dalla-Favera and M. Nussenzweig (2015). "Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*. 2012; 120 (11): 2240-2248."
- Visone, R. and C. M. Croce (2009). "MiRNAs and cancer." The American journal of pathology **174**(4): 1131-1138.
- Vockerodt, M., L. F. Yap, C. Shannon-Lowe, H. Curley, W. Wei, K. Vrzalikova and P. G. Murray (2015). "The Epstein–Barr virus and the pathogenesis of lymphoma." The Journal of pathology **235**(2): 312-322.
- Wan, L.-Y., J. Deng, X.-J. Xiang, L. Zhang, F. Yu, J. Chen, Z. Sun, M. Feng and J.-P. Xiong (2015). "miR-320 enhances the sensitivity of human colon cancer cells to chemoradiotherapy in vitro by targeting FOXM1." Biochemical and biophysical research communications **457**(2): 125-132.
- Wang, H., A. Wang, Z. Hu, X. Xu, Z. Liu and Z. Wang (2016). "A Critical Role of miR-144 in Diffuse Large B-cell Lymphoma Proliferation and InvasionmiR-144 Suppresses BCL6 in B-cell Lymphoma." Cancer Immunology Research **4**(4): 337-344.

- Wilson, J., J. Bell and A. Levine (1996). "Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice." The EMBO journal **15**(12): 3117-3126.
- Wilson, J. and A. Levine (1992). The oncogenic potential of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in transgenic mice. Mechanisms in B-Cell Neoplasia 1992: Workshop at the National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, April 21–23, 1992, Springer.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory and S. Diederichs (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nature cell biology **11**(3): 228-234.
- Wright, D. (1966). "Burkitt's tumour in england a comparison with childhood lymphosarcoma." International journal of cancer **1**(5): 503-514.
- Yang, A., J. Ma, M. Wu, W. Qin, B. Zhao, Y. Shi, Y. Jin and Y. Xie (2012). "Aberrant microRNA-182 expression is associated with glucocorticoid resistance in lymphoblastic malignancies." Leukemia & Lymphoma **53**(12): 2465-2473.
- Yao, J., L.-h. Liang, Y. Zhang, J. Ding, Q. Tian, J.-j. Li and X.-h. He (2012). "GNAI1 suppresses tumor cell migration and invasion and is post-transcriptionally regulated by Mir-320a/c/d in hepatocellular carcinoma." Cancer biology & medicine **9**(4): 234.
- Yates, J. L., N. Warren and B. Sugden (1985). "Stable replication of plasmids derived from Epstein–Barr virus in various mammalian cells." Nature **313**(6005): 812-815.
- Yin, Y., M. Li, H. Li, Y. Jiang, L.-Y. Cao, H.-f. Zhang and X.-C. Xu (2010). "Expressions of 6 microRNAs in prostate cancer." National Journal of Andrology: 599-605.
- Young, L., C. Dawson and A. Eliopoulos (2000). "The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes." Molecular Pathology **53**(5): 238.
- Yu, J., J.-G. Wang, L. Zhang, H.-P. Yang, L. Wang, D. Ding, Q. Chen, W.-L. Yang, K.-H. Ren and D.-M. Zhou (2016). "MicroRNA-320a inhibits breast cancer metastasis by targeting metadherin." Oncotarget **7**(25): 38612.
- Zech, L., U. Haglund, K. Nilsson and G. Klein (1976). "Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas." International journal of cancer **17**(1): 47-56.
- Zhang, J., D. D. Jima, C. Jacobs, R. Fischer, E. Gottwein, G. Huang, P. L. Lugar, A. S. Lagoo, D. A. Rizzieri and D. R. Friedman (2009). "Patterns of microRNA expression characterize stages of human B-cell differentiation." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **113**(19): 4586-4594.
- Zhang, Y., A. Liu, L. Quan, Y. Qu and A. Gu (2018). "Three novel microRNAs based on microRNA signatures for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma." Neoplasma **65**(3): 339-348.
- Zhao, W., Q. Sun, Z. Yu, S. Mao, Y. Jin, J. Li, Z. Jiang, Y. Zhang, M. Chen and P. Chen (2018). "MiR-320a-3p/ELF3 axis regulates cell metastasis and invasion in non-small cell lung cancer via PI3K/Akt pathway." Gene **670**: 31-37.
- Zhou, M., Y. Wu, H. Li and X. Zha (2020). "MicroRNA-144: a novel biological marker and potential therapeutic target in human solid cancers." Journal of Cancer **11**(22): 6716.

EKLER

Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/287

28.04.2022

Sayın Doç. Dr. Sercan ERGÜN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz miR-182, miR-320a, miR-144'ün EBV-pozitif Burkitt lenfoma ile olan ilişkisinin araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2022/209 Karar nolu Genetik çalışma + Patoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 27.04.2022 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

Menderes Fatma Ramazan Büküşoğlu Anadolu Lisesi’ni bitirdikten sonra Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 20.08.2020 tarihinde mezun oldu. 2021 yılında OMÜ Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Orta derecede İngilizce bilmektedir. Deney Hayvanları kullanım sertifikası vardır.

Temel ilgi alanları, kanser, microRNA, lenfoma’dır. (05/06/2023).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0009-0000-8864-2478

Yayınlar:

1. Saydam M, Ergün S. Research of the relationship of miR-182, miR-320a, miR-144 with EBV-positive Burkitt lymphoma. 5. International Congress on Medical Sciences and Multidisciplinary Approaches. 8-9.10.2022, Online (Oral Presentation-Full Text)