

SİMGE ÖZBAKİŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MİR-638-5P VE AKUT MYELOİD LÖSEMİ İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

SİMGE ÖZBAKIŞ

DANIŞMAN
PROF. DR. ŞÜKRÜ ÖZTÜRK

İKİNCİ DANIŞMAN
ÖĞR. GÖR. DR. İLKNUR SÜER

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ve Onur'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bana şans vererek yüksek lisans sürecime adeta yeniden başlamama olanak sağlayan, tüm süreç boyunca bilgi birikimiyle her konuda yol gösteren, olabileceğim en iyi yerde olmam için her zaman beni teşvik eden ve benimle birlikte çabalayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK'e

Tez deneyleri sırasında her şeyi en iyi şekilde öğrenmem için elinden geleni yapan, yol gösteren, karşılaştığımız bütün zorluklara ve aksiliklere rağmen her zaman cesaret ve umut veren, projenin her aşamasında kendi vakitlerinden taviz vererek yardımcı olmaktan çekinmeyen, tez yazarken aklımdaki bütün sorulara cevap olan, daha sayılamayacak bütün emekleriyle destek olan çok sevgili ve kıymetli hocalarım Öğr. Gör. Dr. İlknur SUER ve Dr. Murat KAYA'ya

Son olarak hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen aileme ve bu tezi yazarken bilgisayar başında geçirdiğim zamanlarda yanımdan eksik olmayarak en büyük desteği sağlayan kedim Turuncu'ya teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37151

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lösemi.....	3
2.1.1. Kronik Lenfositik Lösemi	3
2.1.2. Kronik Myeloid Lösemi	4
2.1.3. Akut Lenfoblastik Lösemi	4
2.1.4. Akut Myeloid Lösemi	4
2.1.4.1. Sınıflandırma.....	5
2.1.4.2. İnsidans	7
2.1.4.3. Etiyoloji.....	9
2.1.4.4. Klinik Bulgular ve Tanı	10
2.1.4.5. Prognoz	11
2.1.4.6. Tedavi.....	13
2.1.4.7. AML Hücre Hatları	14
2.2. MikroRNA	16
2.2.1. MiRNA ve Kanseri İlişkisi.....	18
2.2.2. Onkogen MiRNA'lar	18
2.2.3. Tümör Süpresör MiRNA'lar	19
2.2.3.1. MiRNA 638-5p (miR-638-5p)	20
2.3. Tez Çalışmasında miR-638-5p ile İlişkisi İncelenen Aday Hedef Genler.....	22
2.3.1. <i>PGK1</i>	22
2.3.2. <i>HOXA9</i>	22
2.3.3. <i>PIM1</i>	23

2.3.4. <i>MECP2</i>	24
2.3.5. <i>MEF2C</i>	24
2.3.6. <i>SP1</i>	25
2.3.7. <i>SPAG1</i>	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. HL-60 ve NB4 Hücre Hatları Temini	27
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzeme	27
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	28
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılarak Pasajlanması.....	29
3.2.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması.....	29
3.2.3. Hücre Hatlarına miR-638-5p ve Non-Targeting miRNA Mimik Transfeksiyonu	29
3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu.....	31
3.2.4.1. TaqMan Primer/Prob Sistemiyle cDNA Sentezi ve qRT-PZR Yapılarak Transfeksiyon Doğrulama Çalışması	32
3.2.5. miR-638-5p'nin Hücresel Süreçlere Etkisinin Araştırılması	33
3.2.5.1. Hücre Ölümünün (Apoptozun) Değerlendirilmesi İçin Kaspas-3 Deneyi...33	
3.2.5.2. Hücre Canlılığının (Proliferasyon) Değerlendirilmesi için WST8 Deneyi...35	
3.2.5.3. İn Silico Yöntemlerle miR-638-5p'nin Potansiyel Hedef Genlerinin ve Primerlerin Belirlenmesi	36
3.2.5.4. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti İçin cDNA Sentez İşlemlerinin yapılması	37
3.2.5.5. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti için qRT-PZR İşlemlerinin Yapılması	39
3.2.6. İstatiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Hücrelerden RNA Sentezi.....	41
4.2. Transfeksiyon Validasyonu	41
4.3. WST8 Deneyi ile Hücre Canlılığı Ölçümü	42
4.4. Kaspaz 3 Deneyi ile Hücre Ölümü Ölçümü	43
4.5. qRT-PZR Deneyi ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti	44

5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	51
HAM VERİLER	62
FORMLAR	63
PATENT HAKKI İZNİ	64
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	65



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: FAB Sınıflandırmasına göre AML alt tipleri ve prognozları (25-28) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.	5
Tablo 2-2: AML’de risk artışına sebep olan faktörler (41, 42) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.	9
Tablo 2-3: AML’de prognozu etkileyen moleküler ve sitogenetik faktörler (54-57) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.	12
Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan tüketime yönelik malzemeler ve kullanım amaçları ..	27
Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan cihazlar, araçlar ve kullanım amaçları ..	28
Tablo 3-3: cDNA sentezi için kullanılan sarf malzemeler ve miktarları ..	33
Tablo 3-4: qRT-PZR işleminde kullanılan malzemeler ..	33
Tablo 3-5: Apoptoz ölçümünde kullanılan malzemeler ..	34
Tablo 3-6: qRT-PZR işlemlerinde kullanılan primer dizileri ..	37
Tablo 3-7: Primer karışımı için kullanılan malzemeler ..	38
Tablo 3-8: Reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler ..	38
Tablo 3-9: cDNA sentezi için uygulanan PZR protokolü ..	39
Tablo 3-10: qRT-PZR işlemleri için hazırlanan karışım ..	39
Tablo 4-1: NanoDrop ND-200c (Thermo Fisher) spektrofotometre bulguları ..	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: WHO verilerine göre 2020 yılında en çok ölüme sebep olan kanser türleri ve ölüm sayıları (Tüm yaş grupları içerisinde) (17)'den değiştirilerek alınmıştır.	3
Şekil 2-2: AML'de 5 yıllık sağ kalım oranının yaşa bağlı olarak değişimi (24)'deki veriler kullanılarak oluşturulmuştur.	5
Şekil 2-3: Çeşitli yaş grupları ve tedavi sonrası 5 yıllık sağ kalım oranları ilişkisi (28)'den değiştirilerek alınmıştır.	8
Şekil 2-4: 2019 yılında Amerika'da tespit edilen yeni vaka ve ölüm sayılarının lösemi alt türlerine göre dağılımı (39) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.	9
Şekil 2-5: 2000-2017 verilerine göre popülasyonda kadın ve erkek AML insidansı karşılaştırması (43)'tan değiştirilerek alınmıştır.	10
Şekil 2-6: AML'de mortalite ve yaş ilişkisi (59)'taki veriler kullanılarak oluşturulmuştur.	13
Şekil 2-7: 2010-2016 verilerine göre tanı üzerinden geçen zaman ve sağkalım oranı ilişkisi (28)'ten değiştirilerek alınmıştır.	14
Şekil 2-8: HL-60 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü (72)'den değiştirilerek alınmıştır.	15
Şekil 2-9: NB4 hücrelerinin mikroskoptaki morfolojik görüntüleri (75)'ten değiştirilerek alınmıştır.	16
Şekil 2-10: MiRNA oluşum mekanizması (48)'den değiştirilerek alınmıştır.	17
Şekil 2-11: 19p13.2 lokasyonunda bulunan miR-638-5p'nin Genomik Yapısı (106)'dan değiştirilerek alınmıştır.	21
Şekil 2-12: hsa-mir-638'e ait stem-loop sekansı (107)'den değiştirilerek alınmıştır.	21
Şekil 2-13: <i>PGK1</i> Geni (113)'ten değiştirilerek alınmıştır.	22
Şekil 2-14: <i>HOXA9</i> Geni (117)'den değiştirilerek alınmıştır.	23
Şekil 2-15: <i>PIM1</i> Geni (122)'den değiştirilerek alınmıştır.	23
Şekil 2-16: <i>MeCP2</i> Geni (127)'ten değiştirilerek alınmıştır.	24
Şekil 2-17: <i>MEF2C</i> Geni (131)'ten değiştirilerek alınmıştır.	25
Şekil 2-18: <i>SP1</i> Geni (134)'den değiştirilerek alınmıştır.	25
Şekil 2-19: <i>SPAG1</i> Geni (139)'dan değiştirilerek alınmıştır.	26
Şekil 3-1: HL-60/NB4 hücrelerine mimik transfeksiyonu için 6 kuyucuklu plate tasarımı.	31

Şekil 3-2: Hücre canlılığı ölçümü için 96 kuyucuklu plate'e ekilen hücreler.	36
Şekil 4-1: HL-60 ve NB4 hücrelerinde miR-638-5p mimik transfeksiyonunun doğrulaması.....	41
Şekil 4-2: HL-60 hücreleri için proliferasyon bulguları (*: $p<0,05$)	42
Şekil 4-3: HL-60 hücreleri için proliferasyon bulguları (*: $p<0,05$)	43
Şekil 4-4: NB4 hücre hattı için Human Caspase 3 Instant ELISA Kiti ile elde edilen apoptoz bulguları (*: $p<0,05$)	43
Şekil 4-5: NB4 hücrelerinde rölatif ekspresyon bulguları (*: $p<0,05$)	44
Şekil 4-6: HL-60 hücrelerinde rölatif ekspresyon bulguları (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$)	45



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi

AML: Akut Myeloid Lösemi

APL: Akut Promyelositik Lösemi

ATRA: All-Trans Retinoik Asit

FAB: French-American-British

HOXA9: Homeobox A9

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

KML: Kronik Myeloid Lösemi

MeCP2: Methyl-CpG Binding Protein 2

MEF2C: Myocyte Enhancer Factor 2C

miRNA: Mikro RNA

PGK1: Phosphoglycerate Kinase 1

PIM1: Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

PLD1: Phospholipase D1

qRT-PZR: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SOX2: SRY-Box Transcription Factor 2

SP1: Specificity Protein 1

SPAG1: Sperm Associated Antigen 1

VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Özbakış, S. (2022). miR-638-5p ve Akut Myeloid Lösemi İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Akut Myeloid Lösemi (AML), yetişkinlerde en sık görülen lösemi çeşididir, çocuklarda ise lösemilerin %20'sinden sorumludur. MikroRNA (miRNA) molekülleri küçük, protein kodlamayan RNA'lardır fakat hedefledikleri mRNA translasyonunu baskırlar. Bu sayede biyobelirteç olma potansiyeli taşımaktadırlar. Son çalışmalarda miRNA'ların birden fazla hedef gen üzerinden işlev gördüğü ve birçok hastalıkla ilişkili oldukları gözlemlenmiştir. miR-638-5p, çeşitli kanser türlerinde tümör boyutu, prognoz gibi kanserin klinik özellikleriyle ilişkilendirilen önemli bir tümör supresör miRNA'dır. Kanser hücrelerinde azalan miR-638-5p ekspresyonunun, azalan sağkalım oranı ve kötü prognozla ilişkilendirildiği düşünüldüğünde, hedef genlerinin aydınlatılması önem taşımaktadır. Bu tez projesinde insan AML hücre hatlarına (HL-60 ve NB4) miR-638-5p mimiği Lipofektamin yardımıyla transfeke edildikten sonra miR-638-5p'nin hücre canlılığına etkisi WST-8, hücre ölümüne etkisi Kaspaz-3 yöntemi aracılığıyla incelenmiştir. miR-638-5p'nin olası hedef genleri miRWalk, miRDB, Targetscan, miRTarBase gibi *in-silico* araçlar kullanılarak, literatürde AML dışında çeşitli kanser türleriyle yapılan çalışmalarda miR-638-5p'nin hedeflediği gözlemlenen fakat AML için araştırılmamış genlerden seçilmiştir. Seçilen *PGK1*, *HOXA9*, *PIM1*, *MECP2*, *MEF2C*, *SP1* ve *SPAG1* genlerinin ifade düzeylerinin miR-638-5p ve non-targeting miRNA transfeke edilen AML hücrelerinde qRT-PZR tekniğiyle araştırılmıştır. miR-638-5p transfeke edilen hücre hatlarının ikisinde de kontrol hücrelere kıyasla *PGK1* ve *PIM1* ifadelerinin istatistiksel olarak anlamlı seviyede baskılandığı tespit edilmiştir. Buna karşın *MECP2*, *MEF2C* ve *SPAG1* genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir istatistiksel değişim saptanmamıştır.

Sonuçta, HL-60 ve NB4 hücrelerinde hücre canlılığını ve hücre ölümünü etkileyebildiği tespit edilen miR-638-5p'nin *PGK1* ve *PIM1* genlerini hedefleyerek AML kanser patogeneğinde rol oynayabileceğine dair ön bulgular elde edilmiştir. AML olgularının yönetiminde faydalı olabilecek mRNA düzeyinde tespit ettiğimiz bulguların, *in-vitro* ve *in-vivo* ileri çalışmalarının yapılması önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: miRNA, miR-638, Akut Myeloid Lösemi, HL-60, NB4

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37151



ABSTRACT

Özbakış, S. (2020). Investigation of the Relationship between miR-638-5p and Acute Myeloid Leukemia. Istanbul University Institute of Health Science, Genetics, MSc Thesis, İstanbul.

Acute Myeloid Leukemia is the most common type of leukemia in adults, and is responsible for 20% of children leukemia. Recent studies shows that miRNAs function through multiple genes and are associated with many diseases. miR-638-5p is an important tumor suppressor and associated with clinical features of cancer like tumor size and prognosis. Because decreased miR-638-5p expression is associated with decreased survival rate and poor prognosis in cancer, it is important to clarify target genes. In this project, the effect of miR-638-5p on cell viability was investigated by WST-8 method and its effect on cell death by Caspase-3 method after miR-638-5p mimic was transfected to human AML cell lines by using Lipofectamine. Using in-silico tools like miRWalk, miRDB, Targetscan, miRTarBase, the possible target genes of miR-638-5p were selected from target genes of miR-638-5p in studies with other cancer types, but were not investigated for AML. Expression levels of selected genes (PGK1,HOXA9,PIM1,MECP2,MEF2C,SP1,SPAG1) were investigated by qRT-PCR in miR-638-5p transfected and control cells. Statistically significant suppression of PGK1 and PIM1 was found in both miR-638-5p transfected cell lines compared to control cells. Otherwise, no statistically significant change was detected in the expressions of MECP2, MEF2C and SPAG1.

As a result, preliminary findings show that miR-638-5p affect cell viability and cell death in AML cells, may play a role in the pathogenesis of AML by targeting PGK1 and PIM1. It is important to conduct further in-vitro and in-vivo studies at the mRNA level, which may be useful in the management of AML cases.

Key Words: miRNA, mir-638, Acute Myeloid Leukemia, HL-60, NB4

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 37151

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Myeloid Lösemi (AML), hematopoez sürecinde blast hücrelerin oluşumu sırasında meydana gelen bozukluk sonucunda ortaya çıkan ve olgunlaşamayan myeloid hücrelerin kanda ve kemik iliğinde birikmesiyle karakterize olan bir tür kan kanseridir (1). AML yetişkinlerde en sık görülen lösemi çeşididir ve çocuklarda görülen lösemilerin %20'sinden sorumludur (2).

Son çalışmalar, gerek hastalığa erken tanı konulması ve prognoz takibi süreçlerinde gerekse potansiyel tedavi ile ilgili süreçlerde hastalığı daha iyi anlamak ve kişinin tedaviye vereceği yanıtı kestirmede biyobelirteç araştırmalarının önemini göstermiştir (3). Hastalığın hücresel ve moleküler düzeyde etkileriyle ilgili çalışmalar son yıllarda artış göstermesine rağmen tedavide istenilen başarının elde edilebilmesi için çok daha fazla araştırmanın yapılması gerekmektedir (4).

MikroRNA (miRNA) molekülleri küçük, protein kodlamayan RNA'lardır fakat post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu düzenlemede görev alırlar. miRNA'lar hedefleri olan protein kodlayan RNA'lara yani hedef mRNA transkriptlerine bağlanarak translasyonu baskırlar ve bu özellikleri sayesinde biyobelirteç olarak kullanılmak için önemli bir adaydır (5). Hücrede miRNA'lar birden fazla hedef gen üzerinden işlev gördüğü için son yıllarda yapılan çalışmalarda birçok hastalıkla ilişkili oldukları gözlemlenmiş ve bu sebeple birçok kanser türünde tanısız biyobelirteç adayı olabileceği bildirilmiştir. Hem tanısız hem de terapötik kullanım potansiyeli olan miRNA çalışmaları klinik açıdan da öneme sahip olabilir (6).

Bu tez projesinde araştırılan miR-638-5p, daha önce çeşitli kanser türleri için incelenmiş ve önceki çalışmalara göre miR-638-5p ekspresyonu tümör boyutu ve prognoz gibi kanserin klinik özellikleriyle ilişkilendirilmiştir (7). Beyin tümörü, karaciğer kanseri, göğüs kanseri ve lösemide yapılan çalışmalarda miR-638-5p ekspresyonunun azalması kötü prognoz, düşük sağ kalım oranı ve metastaz ile ilişkilendirilmiş olup bu kanserler için miR-638-5p'nin biyobelirteç olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (8-10).

miRNA'ların birden fazla hedef geni bulunduğu ve çeşitli kanser türlerinde birçok biyolojik süreçte rol aldıkları için ekspresyon değişimleri her kanser için aynı değildir,

her kanser ve her olası hedef gen için ayrı çalışmalar gerekmektedir. Prostat kanseri, meme kanseri ve özafagus kanserinde artmış ifade seviyesi bildirilen miR-638-5p'nin bu kanserlerde onkogen olarak rol oynadığı buna karşın mide kanseri, karaciğer kanseri ve servikal kanserlerde ise azalmış ifade seviyesine sahip olup tümör supresör rol oynadığı belirlenmiştir. miR-638-5p'nin, mide kanserindeki tümör baskılayıcı etkisini ise 193 olası hedef gen arasından *KCNQ1*, *DNAJC6*, *PNP* genlerini baskılayarak gösterdiği bildirilmiştir (11-13).

Çeşitli kanser türlerinde araştırılan miRNA'lardan biri olan miR-638-5p ile AML ilişkisi konusunda literatür bilgisi oldukça yetersizdir. Yapılan çalışmalara göre miR-638-5p'nin AML için tümör supresör rol oynadığı ve biyobelirteç çalışmalarının klinik sonuçları etkileyebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Fakat AML'de miR-638-5p'nin *CDK2* genini hedefleyerek kanser patogenezeine katkı sağladığının bildirildiği çalışma dışında, diğer potansiyel hedef genler hakkında literatürde bilgi bulunmamaktadır (14).

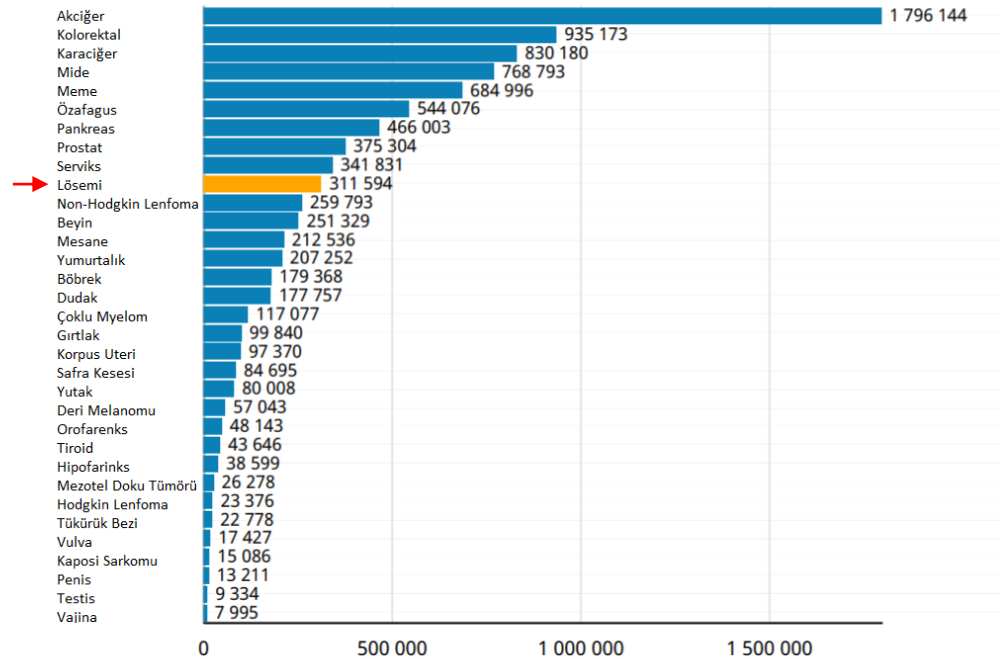
Son yıllarda biyobelirteç potansiyeliyle araştırılan miR-638-5p'nin, diğer kanser türlerinde olduğu gibi AML'de de tümör baskılayıcı rol oynayarak ilerleyen araştırmalarda AML için potansiyel bir tedavi yöntemi olarak önem taşıdığı gözlemlenmiştir. Düşük tedavi ve sağkalım oranına sahip olan AML için de hem tedavi potansiyeli açısından hem de erken tanı ve prognoz açısından biyobelirteç olarak miR-638-5p'nin araştırılması büyük önem taşımaktadır. İlerleyen çalışmalarda bulguların *in-vitro* ve *in-vivo* olarak doğrulanması gerekse de kanser ve miRNA biyobelirteçleri ile ilgili gelecek çalışmalara önemli bilgi sağlayacaktır.

bu tez projesinde HL-60 ve NB4 AML hücre hatlarında öncelikle miR-638-5p hücredeki miktarı lipofektamin aracılı transfeksiyon yöntemiyle arttırılarak, miR-638-5p'nin kanser hücrelerinin canlılığı ve ölümü üzerine fonksiyonel etkileri araştırılmıştır. miR-638-5p'nin potansiyel hedef genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca *in-silico* analizler, literatür araştırması ve veritabanı incelemeleri sonucu miR-638-5p için aday hedef gen olarak belirlenen; *PGK1*, *HOXA9*, *PIM1*, *MeCP2*, *MEF2C*, *SP1* ve *SPAG1* genlerinin anlatımları araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lösemi

Lösemi, kan hücresi oluşum sürecince meydana gelen hatalar sebebiyle kemik iliğinde olgunlaşamayan hücrelerin birikmesiyle karakterize kötü huylu bir hastalıktır. Kan kanseri olarak da bilinir. Şekil 2-1’de görüldüğü üzere lösemi, Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2020 yılında en çok ölüme sebep olan kanserler arasında 10. sıradadır. İnsan vücudundaki bütün sistem ve organları etkileyebilen lösemiler hangi tür kan hücresinin etkilendiğine ve hastalığın seyir hızına göre akut ve kronik, myeloid ve lenfoid olarak iki şekilde sınıflandırılır. Bu sınıflar doğrultusunda lösemi genel olarak Kronik Lenfoblastik Lösemi, Kronik Myeloid Lösemi, Akut Lenfoblastik Lösemi ve Akut Myeloid Lösemi olmak üzere dört alt türe ayrılır (15, 16).



Şekil 2-1: WHO verilerine göre 2020 yılında en çok ölüme sebep olan kanser türleri ve ölüm sayıları (Tüm yaş grupları içerisinde) (17)’den değiştirilerek alınmıştır.

2.1.1. Kronik Lenfositik Lösemi

Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), batı ülkelerinde yetişkinler arasında görülen en yaygın lösemi türüdür. Olgun B-lenfosit hücrelerinin kanda, kemik iliğinde, lenf bezlerinde ve dalakta birikimiyle karakterizedir. Geçtiğimiz on yılda sıkça araştırılan hastalıklardan biri olduğu için, hastalığın patogenezini ve biyolojisini anlamak için

yapılan çalışmalar sayesinde erken tanı ve sağ kalım oranını arttıran tedaviler konusunda oldukça ilerleme kaydedilmiştir (18).

2.1.2. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik Myeloid Lösemi (KML), kromozomal bir anomali olan Philadelphia kromozomuyla ilişkilidir. t(9;22) yani BCR- ABL füzyon geninin oluşması sonucu ABL proto-onkogeninin sürekli aktif hale geçmektedir. Hastalığın sitogenik ve moleküler yapısının birçok kansere kıyasla iyi biçimde aydınlatılabilmesi nedeniyle son yıllarda başarı oranı yüksek tedavi yöntemleri bulunmuştur ve bu nedenle sağ kalım oranı da yüksek olan bir lösemi türüdür. Bcr-Abl translokasyonu sürekli kinaz aktivitesine sebep olduğu için, tedavide kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır (19).

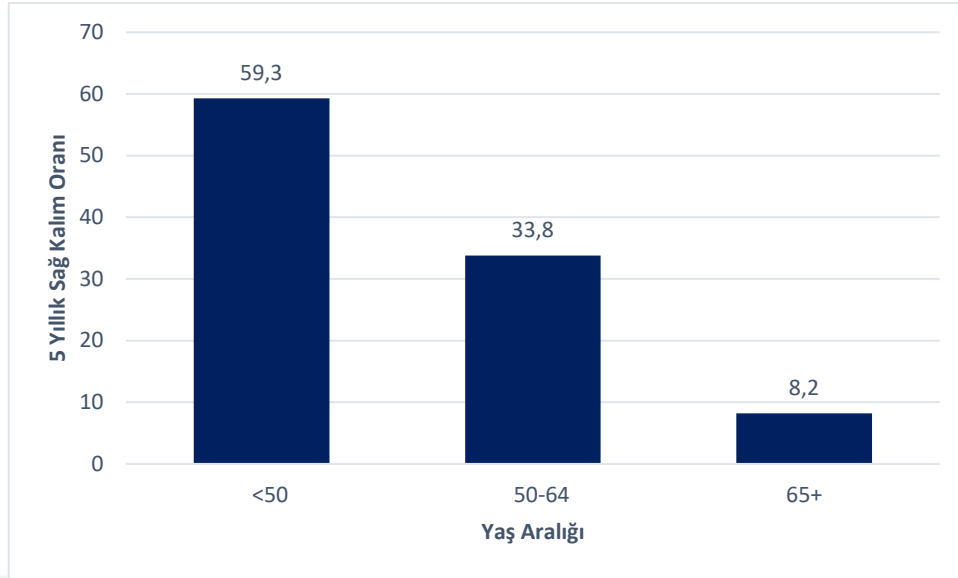
2.1.3. Akut Lenfoblastik Lösemi

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), çocuklarda en yaygın şekilde görülen lösemi türüdür. Çocuklarda sağ kalım oranı çok yüksek olsa da yetişkinler için bu oran düşüktür. Kanda ve kemik iliğinde olgunlaşamayan lenfoid hücrelerin birikimiyle karakterizedir. ALL’de hem B hücreleri hem de T hücrelerinde sitogenetik değişimler gözlenir. Bu yüzden, etkilenen hücre türüne göre Akut B Lenfoblastik Lösemi ve Akut T Lenfoblastik Lösemi olmak üzere iki alt türü vardır (20).

2.1.4. Akut Myeloid Lösemi

Akut Myeloid Lösemi (AML), kan hücresi oluşum sürecinde olgunlaşamayan myeloid hücrelerin birikimiyle ortaya çıkan lösemi türüdür. Yetişkinler arasında görülen en yaygın lösemi türü olup bu gruptaki lösemilerin %80’inden, çocukluk çağı lösemilerinin de yarısından sorumludur (21, 22). Hastalık çoğunlukla sağlıklı bireylerdeki *de novo* mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Klinik olarak, çoğu hastada zararlı, yeteri kadar olgunlaşmamış myeloid hücrelerin kanda, kemik iliğinde ve diğer organlarda biriktiği gözlenir. Kemik iliği infiltrasyonu nedeniyle hastalarda anemi ve bağışıklık sistemi bozukluğu, yorgunluk ve kilo kaybı şikayetleri görülür (21).

AML’de hastalığın moleküler biyolojisini anlama konusundaki yoğun araştırmalar sonucunda elde edilen bulgulara rağmen, genel olarak uzun vadede sağ kalım oranı hala düşüktür. Hastalığın şiddeti yaşa oldukça bağlıdır ve yaş arttıkça sağ kalım oranı da azalmaktadır (Şekil 2-2) (23).



Şekil 2-2: AML’de 5 yıllık sağ kalım oranının yaşa bağlı olarak değişimi (24)’deki veriler kullanılarak oluşturulmuştur.

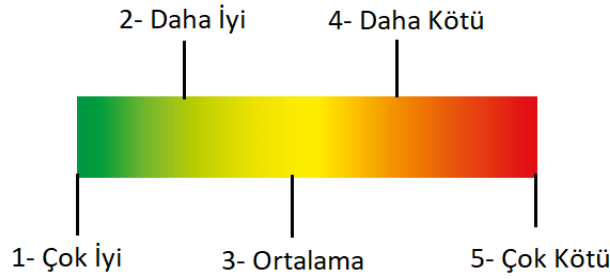
2.1.4.1. Sınıflandırma

Uygun tedavi yönteminin seçilebilmesi ve prognoz tahminleri için AML, Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) grubu tarafından morfolojik özelliklere dayanarak 9 alt tipe ayrılmıştır. AML’nin FAB alt tipleri ve bu sınıflandırmaya göre prognoz tahminleri Tablo 2-1’de görüldüğü gibidir.

Tablo 2-1: FAB Sınıflandırmasına göre AML alt tipleri ve prognozları (25-28) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

FAB Alt Tipi	Alt Tip Adı	Prognoz Derecesi	Oran**
M0	Akut Myeloblastik Lösemi, Farklılaşmamış	4*	%5
M1	Akut Myeloblastik Lösemi, Olgunlaşmamış	3*	%15
M2	Akut Myeloblastik Lösemi, Olgunlaşmış	2*	%25
M3	Akut Premiyolositik Lösemi	1*	%10
M4	Akut Myelomonositik Lösemi	3*	%20
M4 eos	Akut Myelomonositik Lösemi, Eozinofil	2*	%5

M5	Akut Monositik Lösemi	3*	%10
M6	Akut Eritroid Lösemi	4*	%5
M7	Akut Megakaryositik Lösemi	4*	%5



*: Lösemi prognoz derecesi

** Yetişkin AML hastaları arasında görülme oranı

M0, M1 ve M2 alt tipleri myeloid hücreler içerir. M0-AML, Minimum Farklılaşan AML, tüm AML hastalarının yaklaşık %7'sini oluşturur. Genellikle tedaviye dirençle ilişkilidir, kompleks karyotip içerebilir. ALL ile karıştırılabilir fakat M0-AML hücreleri daha büyük, yuvarlak, daha fazla sitoplazma ve çoklu çekirdek içeren morfolojiye sahiptir. Auer cisimciği gözlemlenemez(29). M1-AML'de kemik iliğindeki hücrelerin %90'dan fazlası myeloblasttır. Hücreler yuvarlak çekirdekli ve granülsüzdür fakat az sayıda granül içeren hücreler de gözlemlenebilir. M0'dan daha iyi prognoza sahiptir(30). M2-AML'de hastaların yaklaşık %25'inde kromozom 8 ve 22 translokasyonu [t(8;21)(q22;22)] gözlemlenir. Translokasyon içeren hastalarda daha az relaps oranı ve daha yüksek olaysız sağ kalım oranı görülür. Translokasyon sonucu ortaya çıkan AML-ETO füzyon proteini RT-PZR yöntemi kullanılarak tespit edilebilir. Hücreler genellikle olgunlaşan myeloid blastlardan oluşur. Granülasyon fazladır ve Auer cisimcikleri belirgindir (29).

FAB sıralamasına göre M3 alt tipi olan Akut Premiyolösitik Lösemi (APL), morfolojik, sitogenetik özellikleri ve ATRA tedavisinde verdiği yanıt sebebiyle AML alt tipleri arasında en ayırt edici olandır. Morfolojik yapısında genellikle birden fazla Auer cisimciği görülür. 15. Kromozomda bulunan PML geni ve 17. Kromozomda bulunan RAR- α geni arasında meydana gelen translokasyon [t(15;17)(q22;q12)] sonucu oluşur.

Bu translokasyon sonucu oluşan PML-RAR- α füzyon proteini sebebiyle oluşan proteinlerin anormal fonksiyonları, kan hücrelerinin olgunlaşmadan premyelositik durumda çoğalmalarına ve birikmelerine neden olur. Bu birikim sonucu kanda azalan normal görev yapabilen kan hücresi sayısı, normal beyaz kan hücrelerinin bozulmasına da sebep olur ve hastalık belirtileri görülmeye başlar (29, 31, 32). Amerikada AML hastalıklarının yaklaşık %5'ini oluşturan APL, geçmişte AML alt tipleri arasında en hızlı ölümcül hale gelebilen tip olarak bilinse de günümüzde AML alt tipleri arasında en iyi prognoza sahip olandır. Tam remisyon oranı yüksek olduğu için tedavide çoğunlukla kemik iliği nakline ihtiyaç duyulmaz. Çoğunlukla ATRA ve kemoterapi kullanılarak tedavi edilebilme oranı yüksektir ve tedavi sonrası iki yıllık olaysız sağ kalım oranı %75-84 arasındadır(33, 34).

M4-AML'nin ayırt edici özelliği hücrelerin myeloid ve monositik özellikleri birlikte taşımasıdır. M1 ve M2'den ayırt edilebilmesi için, kemik iliği hücrelerinin %20'den fazlasının monositik özellik göstermesi gerekir. M4-AML'nin alt türü olan M4-eos, kemik iliği hücrelerinin %5 ila %10 arasında eozinofil içermesiyle karakterizedir(29).

M5-AML'nin M5a ve M5b olmak üzere iki varyantı bulunur. İkisinde de monositik kaynaklı blast sayısı %80'den fazladır. M5a daha az yaygın olan formudur ve monositik blastlarda morfolojik farklılaşma görülmez. M5b daha yaygındır ve hücrelerin %20'den fazlası promonosit benzeri yapıdadır (yoğun granülasyon, katlanmış çekirdek). Olgularda t(9;11), t(8;16) gibi kromozom 11 anomalileri görülebilir(29).

Önceden Di Guglielmo Sendromu olarak da bilinen M6-AML'de myeloid benzeri hücrelerde artış ve eritroid hücrelerde morfolojik anomaliler gözlenir. Genellikle anomaliler değişik görünümlü, megablastlar benzeri ve çok çekirdekli eritroidler gözlenmesine yol açar(29).

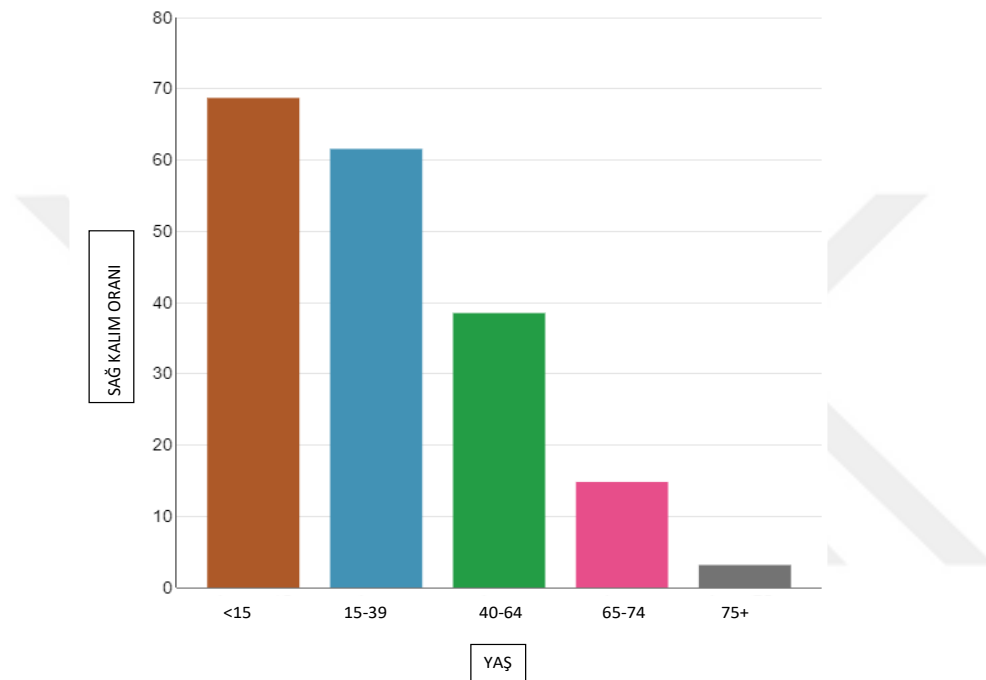
M7-AML, megakaryosit hücrelerde meydana gelen morfolojik anomaliler ile karakterizedir. Megakaryotik displazi ve çok çekirdekli hücreler en büyük tanı materyallerinden biridir. 3. kromozom anomalileri veya çeşitli kromozom delesyonları içerebilir. Kromozom anomalileri kötü prognoz ve düşük sağ kalım oranıyla ilişkilendirilir ve tedaviye yanıt verme oranı düşüktür(29).

2.1.4.2. İnsidans

Amerikan Kanseri Topluluğu'nun verilerine göre Amerika'da her yıl 31.500 kişiye lösemnin herhangi bir alt türünün tanısı konmakta olup çocuklar ve genç yetişkinler

arasında önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Lösemi, 40 yaş altı erkeklerde en ölümcül kanserlerden biridir ve 20 yaş altı kadınlarda da önde gelen ölüm sebeplerinden biridir(35).

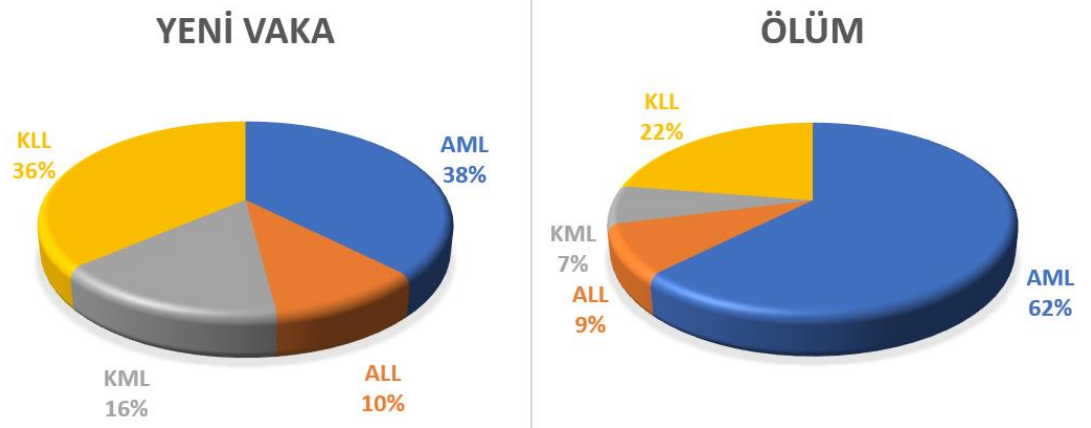
Akut lösemilerin insidansı tüm kanserler arasında %3'ten az olmasına rağmen Batı ülkelerinde tüm lösemilerin %25'ini AML oluşturmaktadır. En yüksek insidans Batı Avrupa ve Amerika'da görülür (36).



Şekil 2-3: Çeşitli yaş grupları ve tedavi sonrası 5 yıllık sağ kalım oranları ilişkisi (28)'den değiştirilerek alınmıştır.

Ortalama yıllık AML insidansı 3.7/100.00'dir. Sağkalım oranı yaş arttıkça azalmaktadır ve tedavi sonrası beş yıllık sağkalım oranı, Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü 2010-2016 yılları arası verilerine göre tüm yaş grupları içerisinde %28,7 olarak hesaplanmıştır (28). Tedaviden sonra 5 yıllık sağ kalım oranı 20 yaşından küçük bireyler için %67, 20 yaşından büyük yetişkinler için %25'tir. Çocuklar yetişkinlerden daha yüksek sağ kalım oranına sahiptir (Şekil 2-3). Çocuklarda tedavi sonrası sağ kalım oranı genellikle %85-90 arasındadır (37, 38).

Şekil 2-4'te görüldüğü üzere Amerikada 2019 yılında tespit edilen yeni vaka sayılarında ve lösemi kaynaklı ölüm sayılarında AML, tüm alt türler arasında en yüksek orana sahiptir.



Şekil 2-4: 2019 yılında Amerika’da tespit edilen yeni vaka ve ölüm sayılarının lösemi alt türlerine göre dağılımı (39) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

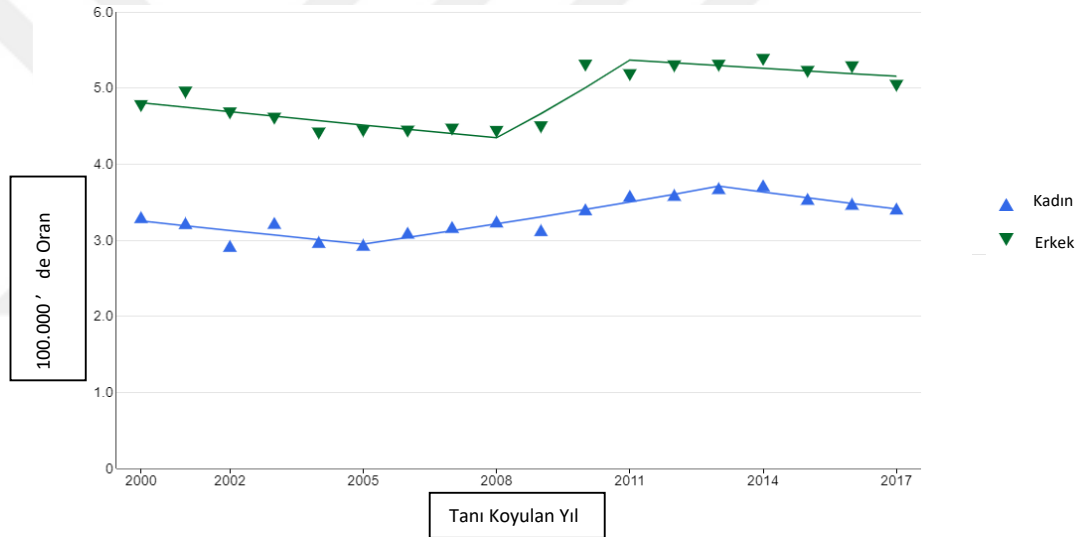
2.1.4.3. Etiyoloji

AML’ye sebep olan DNA mutasyonunun sebebi çoğu zaman belirsizdir ve mutasyon *de novo* olarak ortaya çıkar fakat mutasyonlar için risk artışına sebep olan durumlar vardır. Radyasyona maruz kalma, sigara kullanımı, kanser ve kemoterapi geçmişi ile Down Sendromu gibi genetik hastalıkların varlığı bilinen risk artışı faktörlerinden bazılarıdır (Tablo 2-2)(36, 40). Yaş ve cinsiyet de risk artışına sebep olan faktörlerdendir. Yaş artışıyla AML riski de artmaktadır. Özellikle AML, 65 yaş üstü hastalarda oldukça yaygındır. Erkekler, kadınlara göre AML oluşumuna daha yatkındır (Şekil 2-5). Yine de çoğu vakada hastalığın etiyojisi belirsizdir(41).

Tablo 2-2: AML’de risk artışına sebep olan faktörler (41, 42) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

Sebepler	Örnekler
Kanserojen Maddelere Maruz Kalma	Radyasyon Benzen
Genetik Hastalıklar	Down Sendromu

	Fankoni Anemisi
Kan Hastalıkları	Myelodisplazi
	Myelofibroz
	Polisistemia Vera
	Trombositemi
Hasta Geçmişi	Kanser Geçmişi
	Kemoterapi-Radyoterapi Geçmişi
	Sigara Kullanımı



Şekil 2-5: 2000-2017 verilerine göre popülasyonda kadın ve erkek AML insidansı karşılaştırması (43)'tan değiştirilerek alınmıştır.

2.1.4.4. Klinik Bulgular ve Tanı

Lösemik hücrelerin kontrolsüz artışı ve sağlıklı hücre sayısındaki azalış sebebiyle klinik bulgular ortaya çıkar. Bunlar genel kansızlık belirtileri, kanama, ciltte morarma enfeksiyon ve ateş olarak gözlemlenir. Tam kan sayımında trombosit düşüklüğü, periferik kan yaymasında artmış blast hücreleri AML tanısını destekleyici bulgulardır. Lökosit sayısı yüksek, düşük veya normal olabilir, biyokimyasal testlerde LDH ve ürik asit değerleri yüksektir (44, 45). Kesin AML tanısı için ve kemik iliği aspirasyonu ve kemik

iliği biyopsisi yapılmalıdır. Kemik iliği biyopsisinde %20 ve daha fazla blast hücresi gözlenmesi sonucu kesin AML tanısı koyulur (46). Yetişkin AML hastalarının %55'inde kromozom anomalileri bulunduğu için sitogenetik analiz de şüpheli hastalarda tanı sürecinin bir parçasıdır. Ayırt edici gen füzyonu veya kromozom kaybı içeren alt tipleri ayırt edebilmek için FISH yöntemiyle moleküler sitogenetik analizi yapılabilir. Moleküler genetik analizi için kemik iliği ve kan örneklerinden elde edilen DNA ve RNA örnekleri RT-PZR yöntemiyle incelenmelidir (47).

AML'nin alt tiplerine ait ayırt edici mutasyonları tespit edebilmek ve lösemi çeşitleri arasında AML'yi ayırt edebilmek veya AML alt tipleri arasında sınıflandırma yapabilmek için akım sitometrisi, immünofenotipleme, sitokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler gibi ek inceleme yöntemleri uygulanması gereklidir. Bu yöntemlerle hücre yüzeyindeki bulunan ve alt tiplere özgü olan belirteçler araştırılır. Bazı alt tipler belirli kromozom translokasyonları, delesyonları ve trizomileriyle karakterize olduğu için sitogenetik analiz AML sınıflandırması yapabilmek için gereklidir (48).

2.1.4.5. Prognoz

Prognoz, bir hastalığın olası seyrinin, iyileşme veya tekrar etme olasılığının tahmin edilmesi olarak tanımlanır (49). Bir hastalığın prognozunun doğru yapılması hem en iyi tedavi seçeneğini seçebilmek hem de önlem alabilmek için önemli bir adımdır. Kromozom değişimleri, gen mutasyonları, yaş, beyaz kan hücresi sayısı, kemoterapiye verilen cevap AML için prognoz faktörlerinden bazılarıdır (50).

Sitogenetik ve moleküler anomaliler AML için iyi ve kötü prognozla ilişkilendirilebilir. Kromozom 8 ve 21 translokasyonu, kromozom 15 ve 17 translokasyonu ve kromozom 16 inversiyonu AML için iyi prognozla ilişkilendirilirken kromozom 5 veya 7 delesyonu, kromozom 11'i içeren translokasyonlar kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (36). AML hastalarında artan *DOCK2* gen ekspresyonu ise iyi prognozla ilişkilendirilmiş, *DOCK2* ekspresyonu daha yüksek olan hastaların olaysız sağkalım oranlarının ve genel olarak hayatta kalma oranlarının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (51). Başka bir sitogenetik anomali bulunmadığında, AML hastalarında normal sitogenetiğe eşlik eden *NPM1* mutasyonları daha iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. *NPM1* mutasyonlarına sahip hastalarda daha yüksek tam remisyon oranları ve artan sağ kalım oranları gözlemlenmiştir (52). *ERG* genindeki mutasyonlar sonucu artan *ERG* ekspresyonunun hastalığın agresifliğini arttırdığı gözlenmiş, düşük sağ kalım oranı ve

kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (53). Tablo 2-3'te AML prognozunu etkileyen çeşitli faktörler görülmektedir. İyi prognoz gösteren alt tiplerde kemik iliği nakli ilk seçenek olarak düşünülmez ve genellikle kemoterapi sonrası tam remisyon sağlanır. Kötü prognozlu alt tipler için ise kemoterapi yetersiz kaldığından remisyon olsa bile remisyon sonrası kemik iliği nakli önerilir(34).

Tablo 2-3: AML'de prognozu etkileyen moleküler ve sitogenetik faktörler (54-57) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

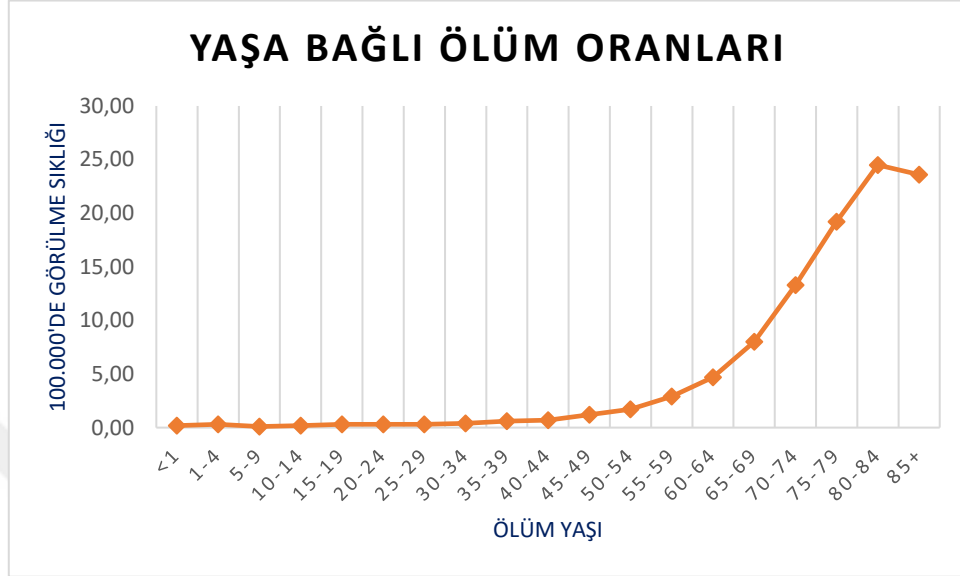
İyi Prognoz	Nötr*	Kötü Prognoz
inv(16)	t(9;11)	FLT3-ITD
t(8;21)	c-KIT Mutasyonu	t(6;9)
t(15;17)	+8	t(9;22)
t(16;16)	+11	inv(3)
İzole NPM1 Mutasyonu	+13	del(5q)
CEBPA Mutasyonu	+21 (Down Sendromu)	-7
	-Y	Kompleks Karyotip**

(*Varlığında ve yokluğunda, tam remisyon ve sağkalım oranlarında anlamlı fark gözlenemeyen anomaliler

**Karyotipin, olumlu prognozla ilişkilendirilen anomaliler dışında 3 veya daha fazla kromozom anomalisi içermesi)

Yaş da prognostik faktörlerden birisidir. Hasta yaşı arttıkça, genellikle 55 ve üstü, azalan beyaz kan hücresi sayısı, artan gen mutasyonları ve kromozomal anomaliler, tedaviye karşı azalan vücut direnci sebebiyle artan hasta yaşı, daha kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Yaş artışı ile sağ kalım oranı, tam remisyon oranı, hastalıksız sağkalım oranında periyodik olarak azalma gözlenmiştir. Şekil 2-6'da hasta yaşı arttıkça ölüm

sayısının da arttığı görülmektedir. Hasta yaşı arttıkça tedaviye verilen tam cevapta, uzun dönem sağkalım oranında azalma ve indüksiyon tedavisinden sonra ölüm oranında artış gözlenmiştir (58).



Şekil 2-6: AML’de mortalite ve yaş ilişkisi (59)’taki veriler kullanılarak oluşturulmuştur.

2.1.4.6. Tedavi

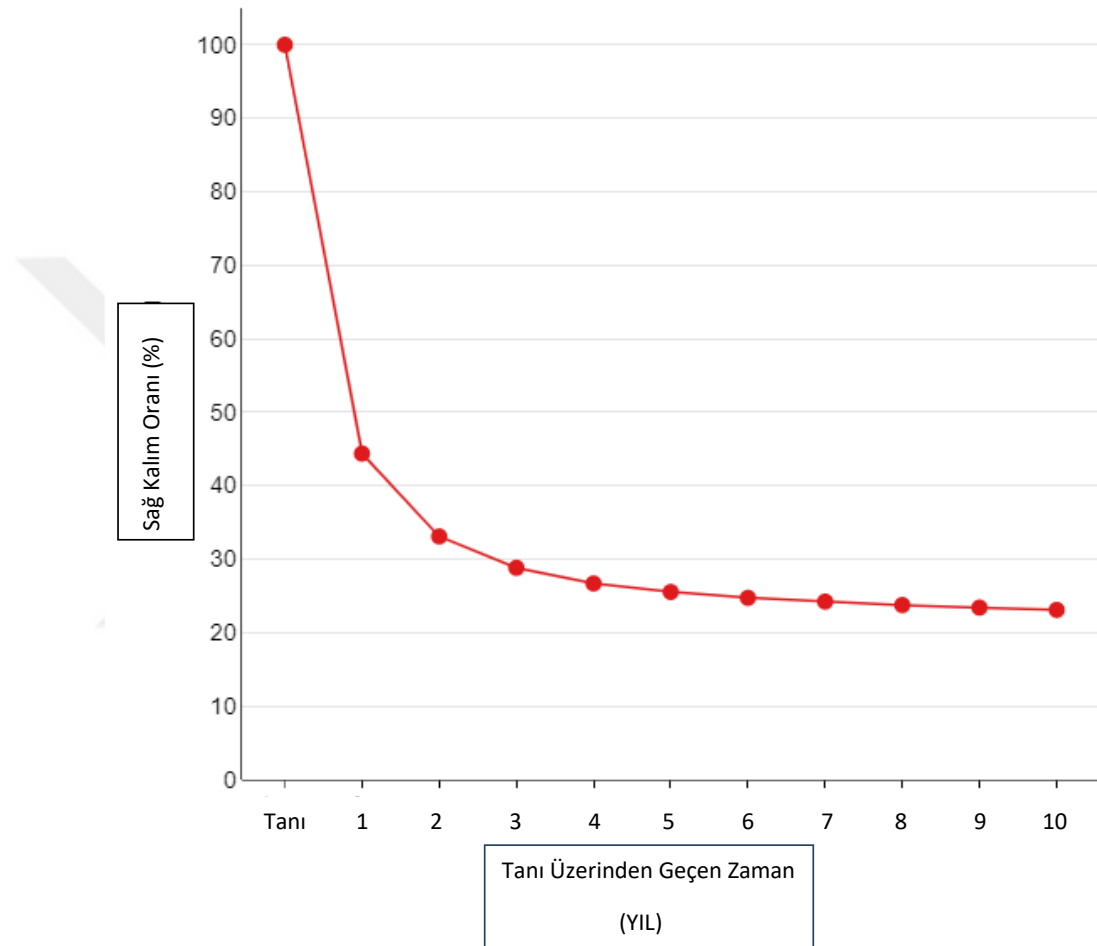
AML çok hızlı ilerleyebilen ve kötüleşebilen bir hastalık olduğu için tanı konduktan sonra en kısa sürede tedaviye başlanmalıdır. Şekil 2-7’de tanı üzerinden geçen zaman ve sağkalım oranı ilişkisi görülmektedir. Tedavi çoğunlukla İndüksiyon ve Konsolidasyon olarak iki faz içeren kemoterapiden oluşur (60).

İndüksiyon, vücudun yoğun kemoterapiye hazırlık yapabilmesine olanak sağlamak için düşük dozlarda kemoterapi ile başlar. Yoğun kemoterapi aşamasında kandaki ve kemik iliğindeki kanser hücrelerini öldürebilme amacıyla hastalara yüksek dozda kemoterapi verilir. Kemoterapide genellikle iki ilaç birlikte uygulanır. Düzenli olarak kan transfüzyonu gereklidir, gerekli olduğu durumlarda antibiyotik kullanımı da önerilebilir. Eğer hastanın vücudu yüksek dozda kemoterapiye uygun değilse, düşük dozda farklı kemoterapi ilaçlarıyla tedavi denenebilir (61).

Konsolidasyon, remisyon sağlandıktan sonra hastalığın tekrarını önlemek ve hastanın remisyon durumunun devamını sağlayabilmek amacıyla uygulanan pekiştirme tedavisi yöntemidir. Birkaç ay daha süren birkaç doz kemoterapi, kemik iliği ve kök hücre nakli konsolidasyon tedavileri olarak kullanılabilir. Tedavi süresince kemoterapi yan

etkileri genellikle mide bulantısı, kolay kanama ve çürük oluşumu, ishal, yorgunluk, saç kaybı, ağız yaraları, kalıcı veya geçici kısırlık şeklinde görülür (62).

AML tedavisinde genellikle Sitarabin ve bir Antrasiklin ilacı kombinasyonları kemoterapi tedavisinde kullanılır. Bu ilaçların yaygın yan etkileri saç kaybı, ağız yaraları, iştah kaybı, ishal veya kabızlık, mide bulantısı olarak bildirilmiştir (63).



Şekil 2-7: 2010-2016 verilerine göre tanı üzerinden geçen zaman ve sağkalım oranı ilişkisi (28)'ten değiştirilerek alınmıştır.

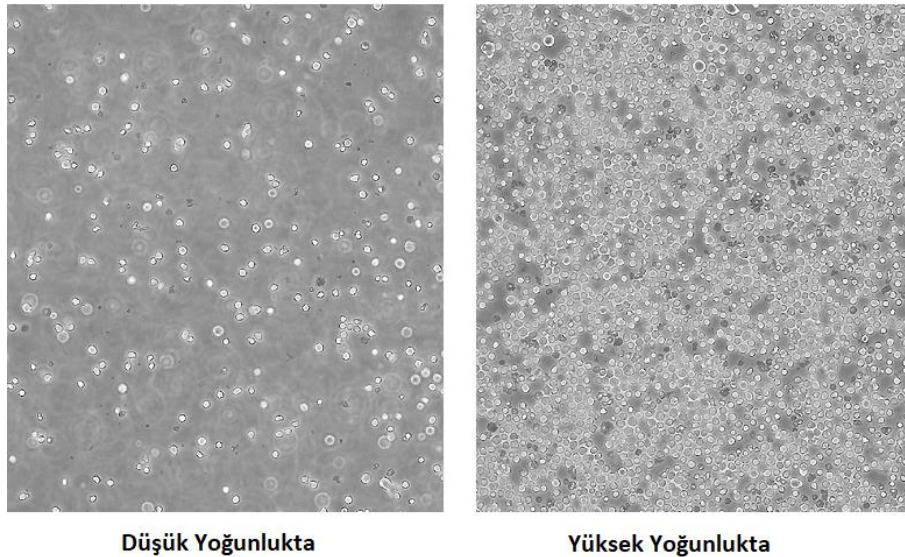
2.1.4.7. AML Hücre Hatları

Hastalığa ait hücre hatları hem hastalık patogenezinin daha iyi anlaşılması, hem de hücrelerin olası tedavi seçeneklerine vereceği tedavinin araştırılması adına uzun yıllardır *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. Hastalığa spesifik ve belirli genetik mutasyonları içeren bu hücre hatları direkt olarak tümör dokusundan ya da periferik kandan izole edilen hücreler olabilir. Lösemi, kan hücrelerini etkileyen bir kanser türü

olduğu için lösemi hücre hatları genellikle hastaların periferik kanından (HL-60) elde edilen hücrelerdir (64). Bunun yanında KG-1 gibi kemik iliği kültürü ile elde edilen lösemi hücre hatları da bulunmaktadır (65).

Yıllar boyu hastalardan çeşitli alt tiplere ait insan lösemi hücreleri izole edilmiş ve *in vitro* kansere karşı çalışmalarda kullanılmıştır. Kasumi-1, HL-60 (64), NB4, U937, THP-1 ve KG1 (66-68) AML hücre hatlarından bazılarıdır.

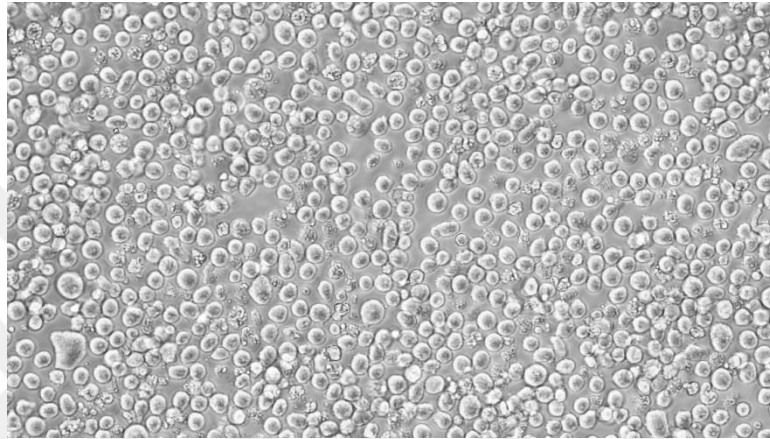
HL-60 hücre hattı, FAB sıralamasına göre M3 alt tipine sahip Akut Myeloid Lösemi hastası bir kadının periferik kanından köken alan premyolösitik hücre hattıdır (69). Premiyolösit hücrelerinden oluşan hücre hattı süspansiyon kültürde büyümektedir ve iki katına çıkma süresi 36-48 saat arasında değişmekle birlikte ortalama 40 saattir. Düşük ve yüksek yoğunlukta mikroskop altında beklenen görüntüleri Şekil 2-8'de görüldüğü gibidir. Diğer insan lösemi hücrelerinin aksine HL-60 hücreleri süspansiyon kültürde sınırsız çoğalabilen hücrelerdir. HL-60 hücreleri bazı hücre genleri (c-myc, N-ras, p53) etkileyen yapısal değişiklikler içerdiği için, kanser hücre proliferasyonu ve onkogen ekspresyonu çalışmalarında önemli bir model olmuştur (70). HL-60 hücre hattının %10 FBS içeren IMDM veya RPMI-1640 besiyerlerinde, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilerek çoğaltılabildiği bilinmektedir. (71).



Şekil 2-8: HL-60 hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü (72)'den değiştirilerek alınmıştır.

NB-4 hücre hattı (Şekil 2-9), FAB sınıflandırmasına göre AML M3 alt tipi (APL) lösemili hastanın kemik iliğinden türetilmiş, süspansiyon kültürde sınırsız çoğalabilen hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler (15;17) translokasyonu sebebiyle *PML-RARA* füzyon genini taşımaktadır. Hücreler önerilen besiyeri olan %10 FBS içeren RPMI-1640 ile 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edildiğinde ikiye katlanma süresi 35-45 saat arasında değişmektedir (73, 74).

Yüksek Yoğunlukta

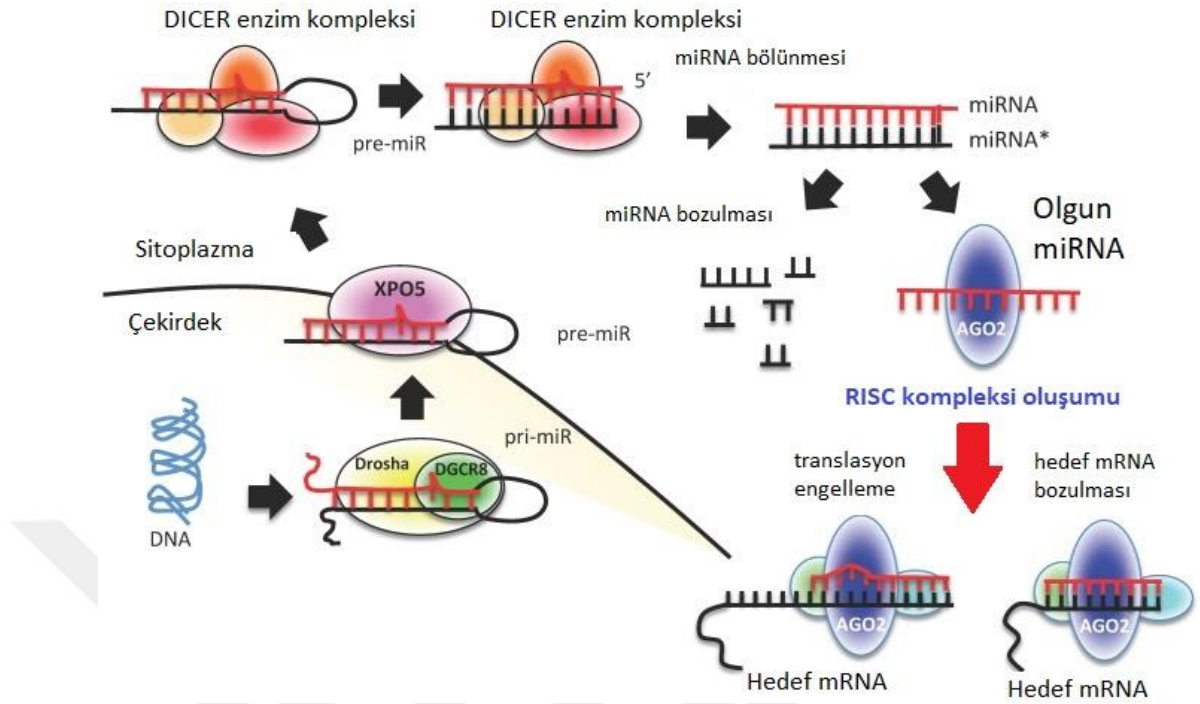


Şekil 2-9: NB4 hücrelerinin mikroskoptaki morfolojik görüntüleri (75)’ten değiştirilerek alınmıştır.

Bu tez projesinde AML hücre hattı olarak t(15;17) negatif HL-60 ve t(15;17) pozitif NB4 hücreleri kullanılmıştır.

2.2. MikroRNA

MikroRNA (miRNA)’lar genellikle 17-25 nükleotidden oluşan, küçük ve protein kodlamayan RNA’lardır. miRNA’lar hedef mRNA transkriptine bağlanarak transkript yıkımına yol açar veya translasyonu baskılayarak gen ifadesini negatif yönde düzenler. Asıl görevleri mRNA yıkımına sebep olarak protein seviyesi ayarlamak olan miRNA’ları kodlayan diziler insan genomunun %1-3’ünü oluşturur (76, 77). Birçok biyolojik süreçte görev alan miRNA’lar birçok hastalığın da oluşum sürecine katkıda bulunur (78). Alzheimer, kalp hastalıkları ve diyabet gibi hastalıkların da oluşum sürecinde rol alan miRNA ekspresyon düzeyleri genellikle kanser türleri için prognoz ve sağ kalım oranlarıyla ilişkilendirilir (79).



Şekil 2-10: MiRNA oluşum mekanizması (48)'den değiştirilerek alınmıştır.

RNA polimeraz II enzimi tarafından çekirdekte üretilen, henüz olgunlaşmamış ve işlev göremeyen miRNA'lara pri-miRNA denir. MiRNA olgunlaşma ve işlev görme süreci Şekil 2-10'da görüldüğü gibi, ilerleyen işlemler için çekirdekte üretilen pri-miRNA Drosha enzimi ve DGCR8 proteininden oluşan kompleks tarafından tanınmasıyla başlar ve bu işlem sonucunda pre-miRNA oluşur (80, 81). İşlenen pre-miRNA, exportin 5 proteini tarafından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, DICER1 geni tarafından kodlanan DICER enzimi tarafından işlenen ve ikiye bölünen pre-miRNA, çift ssarmallı olgun miRNA'ya dönüşür. Olgun miRNA'nın ilerleyen işlemlerde görev alacak olan kılavuz zinciri RISC kompleksiyle etkileşime geçerken diğer zincir hücre içi bozulmaya uğrar. RISC kompleksine bağlanan kılavuz zincir, kompleksin AGO2 proteinine yol göstererek kompleksin hedef mRNA dizisinin 3'UTR bölümüne karşıt olarak bağlanmasını sağlar. Bu bağlanmadan sonraki süreçte miRNA ve RISC kompleksi hedef mRNA translasyonunu önleyebilir ya da direkt hedef mRNA transkriptini parçalayabilir. Her iki durumda da hedef mRNA ekspresyonu baskılanmış olur (82-84).

2.2.1. MiRNA ve Kanser İlişkisi

MiRNA'lar, kanser biyolojisinin apoptoz, metastaz ve proliferasyon gibi birçok sürecinde rol alır. Bu yüzden miRNA ekspresyonu, kanser tipi, kanser evresi, hasta tarafından tedaviye verilen yanıt ve klinik değişimler ile ilişkilendirilebileceği için son yıllarda miRNA'ların özellikle kanser tanı ve prognozu için biyobelirteç olarak kullanım çalışmaları artış göstermiştir (85). Dolaşımda bulunan ve tespit edilen miRNA'lar, oral kanserler gibi bazı kanser türleri için invazif olmayan biyobelirteçler olarak likit biyopsi çalışmalarında kullanım için araştırma aşamasındadır (6).

Ekspresyon analizlerine göre miRNA'lar onkojenik veya tümör supresif olarak sınıflandırılabilir. Onkojenik olarak davranan miRNA'ların ekspresyonu engellendiğinde kanser hücre bölünmesinde azalma ve tedaviye verilen yanıtta artışlar gözlenir. Tam tersi tümör supresif olarak davranan miRNA'lar için de ekspresyon azalışı kanser oluşumuyla ilişkilendirilir ve bu şekilde miRNA'lar biyobelirteç olarak tanı ve prognoz için kullanılabilir. Örneğin Kolorektal kanser için miR-126 ve miR-31 onkojenik davranırken miR-192, miR-215 ve miR-148a tümör supresör olarak davranır. Bu yüzden miR-192, miR-215 ve miR-148a ekspresyonundaki azalma kolorektal kanserde tanısal biyobelirteç olma potansiyeli taşımaktadır (86).

Kolon kanseri ve Meme kanseri örneklerinde araştırılan miR-155 ve miR-21 için, hastaların plasma ve serum örneklerinde artan miRNA ekspresyonu gözlenmiş ve özellikle miR-155 için bu artış hastalarda metastaz ile ilişkilendirilmiştir (87). Meme kanseri için hasta örnekleri ve sağlıklı örnekler karşılaştırıldığında, miR-331 ekspresyonunun metastatik meme kanseri örneklerinde önemli oranda artmış olduğu, miR-195 ekspresyonunun ise tam tersi önemli oranda azalmış olduğu gözlemlenmiştir. Dolaşımda bulunan bu iki miRNA, metastatik meme kanserinin tanısı ve hastanın tedaviye vereceği yanıtı kestirmede ve biyobelirteç olarak kullanımı konusunda potansiyel taşımaktadır (88). Tanı ve prognoz bilgilerinin invazif olmayan yöntemlerle elde edilebilmesinin ötesinde, miRNA'lar tümör supresör genlerin ekspresyonunu arttırmak veya onkogenlerin ekspresyonunu azaltmak yoluyla terapötik olarak kullanım potansiyeli taşımaktadır (86).

2.2.2. Onkogen MiRNA'lar

Onkogen miRNA'lar (OnkomiR), hücre döngüsüne etki ederek hücrelerin proliferasyon yeteneğini arttırıcı özelliklere sahiptir bu yüzden kanser gibi hastalıklarla

doğrudan ilişkilendirilmiştir. OnkomiR'lerin hedef genleri tümör süpresör genler olduğu için, artan onkomiR miktarı tümör süpresör gen ekspresyonunu azaltır ve hücre döngüsünde bozulmalar meydana gelir (89).

RT-PZR yöntemiyle incelendiğinde, normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde anlamlı oranda artmış ekspresyon gösteren miRNA'lar onkogen miRNA olarak sınıflandırılır. Bu miRNA'ların ekspresyonunun azalması da hedef tümör süpresör gen ekspresyonunda artışa sebep olacağı için, çeşitli kanser türlerinde tedavi seçeneği olarak araştırılmaktadır (90). Meme kanseri için miR-21 ve miR-200c onkogen miRNA'lar olarak tanımlanmış, meme kanseri hücrelerinde artan miRNA ekspresyonu gözlemlenmiş ve bu yüzden tanısı biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri sonucuna ulaşılmıştır (91). Kolorektal kanser için artan ekspresyon gösteren miR-145, meme kanseri için ise miR-21 ve miR-155 onkogen miRNA olarak sınıflandırılmış ve olası tedavi çalışmalarında miRNA mimikleri ve miRNA inhibitörleri yardımıyla hücrede miR-145, miR-21, miR-155 ekspresyonlarının azaltılması üzerinde çalışılmıştır (92).

Akut Myeloid Lösemi hastalarının kemik iliği örnekleriyle yapılan çalışmalarda miR-155, miR-125b ve miR-100'ün hücrelerde artan ekspresyon gösterdiği ve bu artışın AML patogeneziyle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Ekspresyonu artan miR-155'in hücre proliferasyonunda artışa yol açtığı, miR-125b'nin hedef genlerinden biri olan p53 ekspresyonunu azaltarak lösemi oluşumuna yol açtığı ve miR100'ün ise tümör süpresör olan RBSP3 genini hedefleyerek ekspresyon azalışına yol açtığı gösterilmiştir (93). Ayrıca miR-181 ailesine ait üç miRNA (181a-3p, 181a-2-3p ve 181b-5p) da AML için artan ekspresyon artışı, onkogen davranış göstermiş ve terapötik çalışmalar için uygun hedefler olabilecekleri gözlemlenmiştir (94).

2.2.3. Tümör Süpresör MiRNA'lar

Onkogen miRNA'ların aksine, kanser hücreleri ve normal hücreler RT-PZR yöntemiyle incelendiğinde, kanser hücrelerinde tümör süpresör miRNA'ların ekspresyonunda azalma gözlenir. Bu azalma miRNA'ların hedef genleri olan onkogenlerin ekspresyon miktarında artışa sebep olacağı için, azalan tümör süpresör miRNA miktarı ve artan hedef genler kanser hücrelerinde koloni oluşumu ve artan tümör büyümesiyle ilişkilendirilmiştir (95, 96).

Kolorektal kanser hücrelerinde tümör süpresör olan miR-143 ve miR-145 ekspresyon miktarlarında anlamlı azalma gözlenmiş ve bu miRNA'ların kanser tespiti

için tanısal biyobelirteç adayı olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (97). Kolorektal kanser için incelenen bir diğer miRNA olan miR-8073'ün, aday hedef genleri olan beş onkogene bağlandığı ve gen ekspresyonunda azalmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. Kanser hücrelerinde azalmış ekspresyon gösteren miR-8073, ekspresyon artışı sağlandığında kanser tedavisinde kullanılmak üzere terapötik bir aday olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (98). Prostat kanseri, meme kanseri, yumurtalık kanseri gibi çeşitli kanserlerde incelenen miR-152, bu kanser hücrelerinde azalan ekspresyon göstermiş ve MET, IRS1, FGF2 gibi çeitli onkogenleri hedeflediği ve bu genlerin ekspresyon artışına neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kanser oluşumunda rol oynayan genleri hedefleyen ve kemoterapi direnciyle de ilişkilendirilen miR-152'nin, ekspresyon artışını sağlayarak çeşitli kanser türleri için terapötik kullanımda ileri araştırmalar için önemli bir aday olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (99).

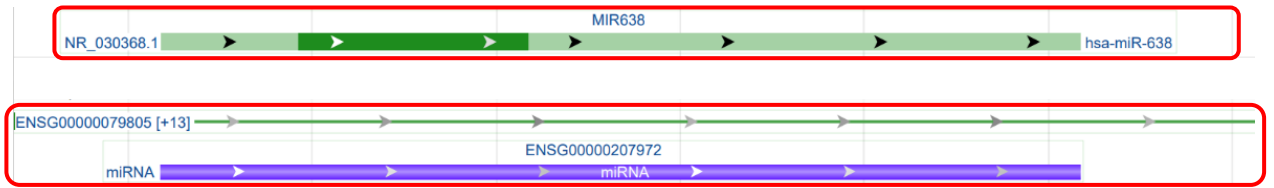
AML hastaları ile yapılan çalışmalarda miR-370 ekspresyonunun sağlıklı örneklerle karşılaştırıldığında anlamlı oranda azaldığı ve hedeflediği onkogen olan FoxM1'in ekspresyon artışına neden olarak kanser hücre proliferasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (100). Aynı şekilde bir diğer tümör süpresör miRNA olan miR-193b, AML hasta örneklerinde anlamlı azalmış ekspresyon göstermiş ve bu yüzden miR-193b'nin hem tanısal biyobelirteç adayı olarak araştırılabileceği, hem de ekspresyonu yeniden arttırıldığında AML için kullanılabilecek aday terapötik ajanlardan biri olduğu bildirilmiştir (101). miR-199b ile yapılan çalışmalarda, AML hastalarında azalan miR-199b ekspresyonu genel olarak kötü prognoz ve düşük sağ kalım oranıyla ilişkilendirilmiş, ayrıca M5 alt tipi için de tanısal biyobelirteç adayı olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır (102).

Tümör süpresör miRNA'lardan biri olan miR-638-5p, çeşitli solid tümörler ve AML örneklerinde anlamlı oranda azalmış ekspresyon göstermiş ve *CDK2* onkogenini hedeflediği belirlenmiştir (93). Kanser hücre proliferasyonu ve koloni oluşumuyla ilişkilendirilen miR-638-5p ekspresyon azalışı, hem tanısal biyobelirteç araştırmaları için aday özelliği taşımaktadır hem de terapötik çalışmalar için uygun bir adaydır (14).

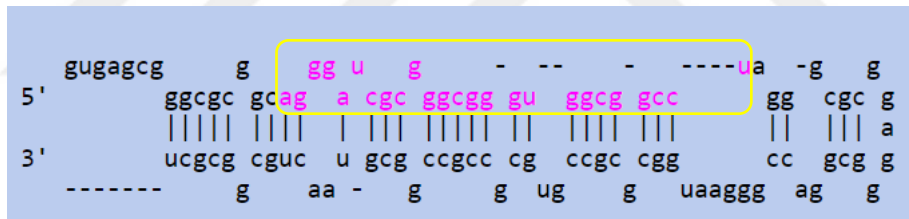
2.2.3.1. MiRNA 638-5p (miR-638-5p)

miR-638-5p (Şekil 2-11, Şekil 2-12) gliomlar (7), hepatosellüler karsinom (8), meme kanseri (9), mide kanseri (103), akciğer kanseri (104) ve lösemi (10) gibi çeşitli kanserler için araştırılmış ve hücrede azalan miR-638-5p miktarı gözlenmiş, bu hastalık

türleri için azalan miR-638-5p metastaz, kötü prognoz ve düşük sağ kalım oranıyla ilişkilendirilmiştir. Her hastalık için farklı hedef genleri bulunabilen miR-638-5p, onkogenleri hedef alarak hedef genlerde ekspresyon azalışına sebep olur ve bu şekilde hücrede tümör supresör olarak davranır. Hücrede tümör baskılayıcı etkisi bulunan miR-638-5p, bu özelliği sayesinde çeşitli kanser türleri ve solid tümörlerde terapötik çalışmalar için uygun bir aday olarak belirlenmiştir (105).



Şekil 2-11: 19p13.2 lokasyonunda bulunan miR-638-5p'nin Genomik Yapısı (106)'dan değiştirilerek alınmıştır.



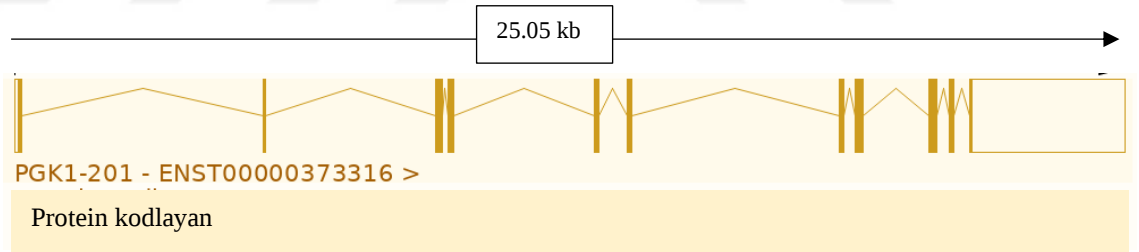
Şekil 2-12: hsa-mir-638'e ait stem-loop sekansı (107)'den değiştirilerek alınmıştır.

Akut Myeloid Lösemi ve miR-638-5p ilişkisini araştıran sadece bir çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmaya göre benzer şekilde, azalan miR-638-5p AML için de hastalık durumunda kötüleşme, kötü prognoz ve artan metastaz ile ilişkilendirilmiş ve bu yüzden miR-638-5p'nin de onkogenleri hedef aldığı ve miR-638-5p artışının terapötik olarak kullanılabileceği ve prognostik biyobelirteç olarak miR-638-5p'ni uygun bir hedef olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. MiR-638-5p'nin heden geni olarak AML hücre hattında yalnızca 1 onkogen (*CDK2*) belirlenebilmiştir (14).

2.3. Tez Çalışmasında miR-638-5p ile İlişkisi İncelenen Aday Hedef Genler

2.3.1. *PGK1*

PGK1 (Phosphoglycerate Kinase 1), oksijenli solunum yolağında 1,3-difosfoglisaratın 3-fosfoglisarata dönüşümünü sağlayan glikolitik enzimi kodlayan ve X kromozomunda lokalize bir gendir. Başta hücre metabolizmasını düzenleme olmak üzere anjiyogenez, otofaji, DNA tamiri gibi birçok biyolojik mekanizmada görevlidir (108). Hücre metabolizmasının birçok yolağında görev alabildiği için kanser hücrelerinin çoğalma mekanizmalarıyla da ilişkilidir. *PGK1* ekspresyon artışının, çeşitli kanser türleri için kanser hücre çoğalması, kötü prognoz, düşük sağ kalım oranı ve artan kemoterapi direncine sebep olduğu gözlenmiştir (109). Karaciğer kanseri (110) ve meme kanseri (111) gibi çeşitli kanser türleri için onkogen olarak davrandığı gösterilen *PGK1*, AML oluşumunda da onkogen olarak rol almaktadır. AML hücre hatlarında artan *PGK1* ekspresyonu gözlemlenmiş, artan *PGK1* kötü prognozla ilişkilendirilmiş ve biyobelirteç adayı olarak *PGK1*'in önemli bir terapötik hedef olabileceği belirlenmiştir (112).

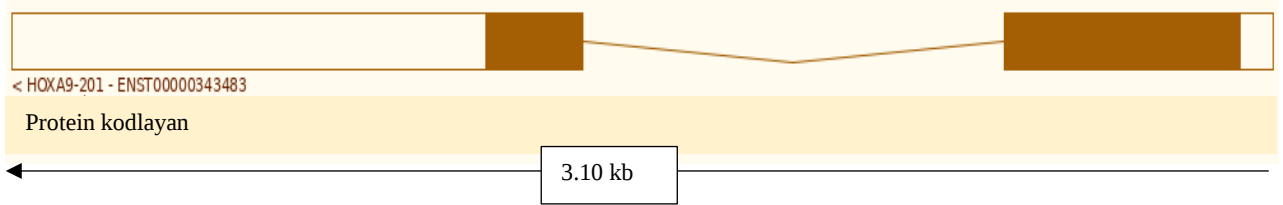


Şekil 2-13: *PGK1* Geni (113)'ten değiştirilerek alınmıştır.

2.3.2. *HOXA9*

HOXA9 (Homeobox A9), 7. Kromozomda bulunan ve gen ekspresyonu, morfogenez, hücresel farklılaşma, embriyonik gelişim gibi farklı süreçlerde görevli birden fazla transkripsiyon faktörünü kodlayan bir gendir (114). Normal hematopoez sürecinde önemli rolleri bulunan *HOXA9* geni çeşitli kanserlerle ve özellikle akut lösemilerle ilişkilendirilmiş, artan *HOXA9* ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (115). Glioma (7) gibi kanserler için onkogen olarak davrandığı gösterilen *HOXA9*, aynı şekilde AML gelişim sürecinde de onkogen olarak rol alır. *HOXA9* ekspresyonunun artması AML için de kötü prognoz ve hastalığın şiddeti ile doğru orantılı olarak ilişkilendirilmiş, bu yüzden *HOXA9* gen ekspresyonunun azaltılması ve

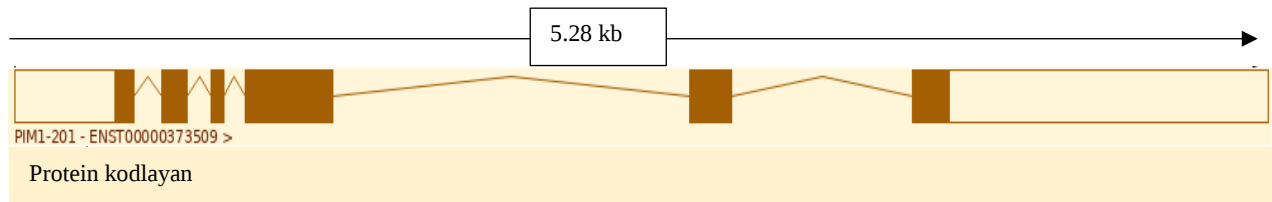
engellenmesi yönündeki terapötik çalışmaların AML'nin gelecek tedavi çalışmaları için büyük önem taşıdığı sonucuna ulaşılmıştır (116).



Şekil 2-14: HOXA9 Geni (117)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.3.3. PIM1

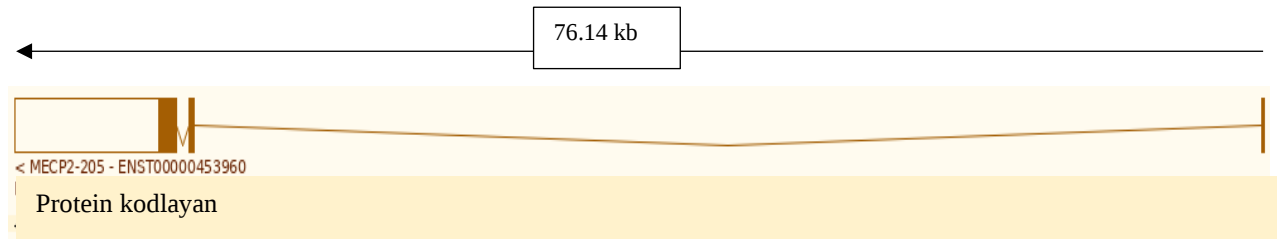
PIM1 (Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), kan hücrelerinde sinyal iletimi, hücre çoğalması ve hayatta kalması süreçlerinde rol alan, 6. kromozomda bulunan ve B-lenfoid ve myeloid hücre hatlarında anlatımı olan bir gendir. Hematopoetik kanserler ve prostat kanserlerinde ekspresyon artışı gözlemlenmiş ve bu yüzden onkogen olduğu bilinmektedir (118). Aynı zamanda normal doku örnekleriyle karşılaştırıldığında, osteosarkom dokularında da artan *PIM1* ekspresyonu gözlemlenmiş ve bu artışın kötü prognoz ve düşük sağ kalım oranıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çeşitli kanser türleri için onkogen olarak davranan bu gen için *PIM1* genini hedef alan ve ekspresyonu azaltmayı hedef alan terapötik çalışmalar bulunmaktadır (119). AML için de onkogen olarak davranan *PIM1* ekspresyonu mRNA düzeyinde hasta örneklerinde sağlıklı örneklerle kıyasla önemli oranda artmış olduğu gözlenmiş, tam remisyona ulaşma süresinin *PIM1* ekspresyon seviyesiyle ters orantılı olduğu görülmüştür (120, 121).



Şekil 2-15: PIM1 Geni (122)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.3.4. *MECP2*

MeCP2 (Methyl-CpG Binding Protein 2), X kromozomunda bulunur ve memelilerin gelişim sürecinde önemli bir yeri bulunan DNA metilasyonu mekanizması için gerekli olan proteinleri kodlayan bir gen ailesindendir. Embriyonik gelişim için gerekli proteinleri kodlayan *MeCP2* genindeki mutasyonlar, nörolojik gelişim ile ilgili hastalıklara yol açabilir ve kadınlarda görülen bilişsel bozuklukların çoğundan sorumludur (123). Mide kanseri için yapılan araştırmalarda, kanser hücrelerinde *MeCP2* düzeyleri hem mRNA hem de protein düzeyinde artış göstermiş, bu artışın hastalar üzerinde düşük sağ kalım oranı ve hastalıksız kalınan sürede azalma gibi etkileri olduğu gözlemlenmiştir (124). Servikal kanser, yumurtalık kanseri, karaciğer ve akciğer kanserleri gibi çeşitli kanser türleri için incelenen *MeCP2*, incelenen çoğu tümör hücre hattında artan ekspresyon göstermiştir. X kromozomunun çoğu kanser hücre hattında çoğalma gösteren spesifik bir bölgesinde bulunduğu için *MeCP2* onkogen olarak sınıflandırılmıştır (125). *MeCP2* mutasyonları genellikle nörolojik hasarlarla ilişkilendirilse de, AML ile ilgilendirilen epigenetik değişimler incelendiğinde *MeCP2* geninin metilasyonu ile ortaya çıkan değişimin AML epigenezinde etkili olabileceği gözlenmiştir (126).

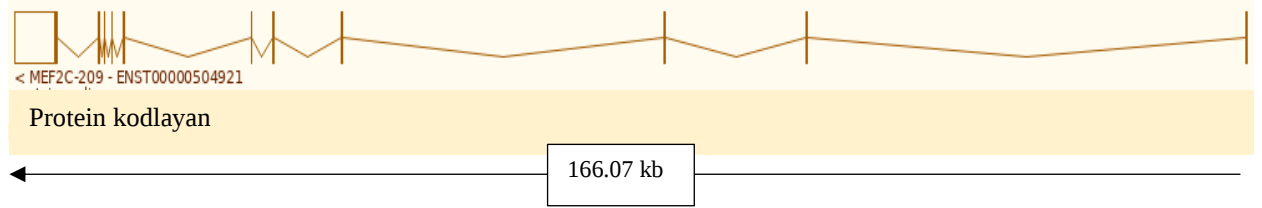


Şekil 2-16: *MeCP2* Geni (127)’ten değiştirilerek alınmıştır.

2.3.5. *MEF2C*

MEF2C (Myocyte Enhancer Factor 2C), miyogenez sürecinde görevli proteinleri kodlayan gen ailesi içinde bulunan ve 5. kromozomda lokalize bir gendir. *MEF2C* geni tarafından kodlanan protein kas hücresi oluşum sürecinde, hücre stabilitesini sağlamakla görevli olduğu için bu gendeki mutasyonlar genellikle epilepsi, ağır bilişsel bozukluklar ve beyin ile ilgili çeşitli hastalıklara sebep olur (128). *MEF2C* ve kanser ilişkisini araştıran çalışmalara göre, karaciğer kanseri (129) ve endometriyal kanser türleri için *MEF2C* gen ekspresyonundaki artış kanser hücresi dayanıklılığı ve düşük sağ kalım oranıyla ilişkilendirilmiştir. MiRNA’lar yardımıyla *MEF2C* ekspresyonu azaltıldığında,

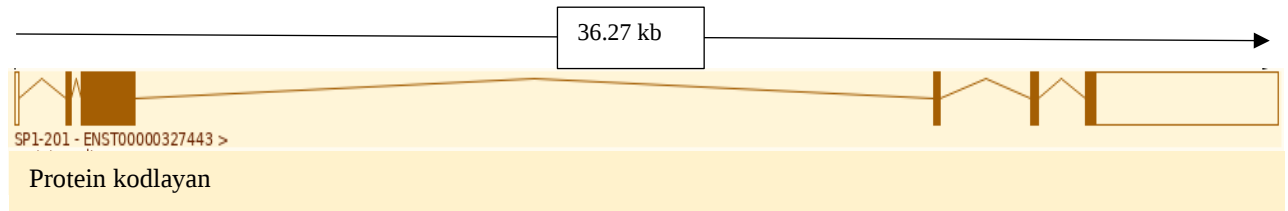
tümör hücresindeki ilerlemeler, metastaz ve migrasyon engellenmiş, tümör hücresi apoptozu indüklenmiştir (11). Çeşitli kanser türleri için onkogen olduğu bildirilen *MEF2C* AML için araştırıldığında, ekspresyon artışı kötü prognoz ve tedaviye verilen düşük yanıtla ilişkilendirilmiş, *MEF2C* geni tarafından üretilen proteinin AML için de onkoprotein olduğu gözlemlenmiştir (130).



Şekil 2-17: MEF2C Geni (131)'ten değiştirilerek alınmıştır.

2.3.6. SP1

SP1 (Specificity Protein 1), hücre farklılaşması, hücre büyümesi, apoptoz, bağışıklık cevabı, DNA hasar onarımı gibi birçok hücresel süreçte görevli olan proteini kodlayan ve 12. Kromozomda lokalize olan bir gendir. *SP1* geni tarafından üretilen bu protein, post translasyonel mekanizmalar sayesinde hücrede aktivator veya represör olarak görev alabilir (132). Çoğu kanser türünde artan ekspresyon artışıyla karakterize olan *SP1* geni, hücre çoğalması, apoptoz ve anjiyogenez yollarını etkileyerek onkogen davranışları seğılemektedir. *SP1* genini hedefleyen miRNA'lar kullanılarak ekspresyon azaltıldığında ise tümör hücrelerinde migrasyon ve invazyon azalması, apoptoz artışı ve tümör hücresi oluşumunda azalma gözlemlenmiştir. Çoğu kanser türünde olduğu gibi, AML oluşum sürecinde de *SP1* geninin onkogen olarak davrandığı, AML hastalarında artan *SP1* gen ekspresyonu gözlemlendiği bildirilmiştir (133).

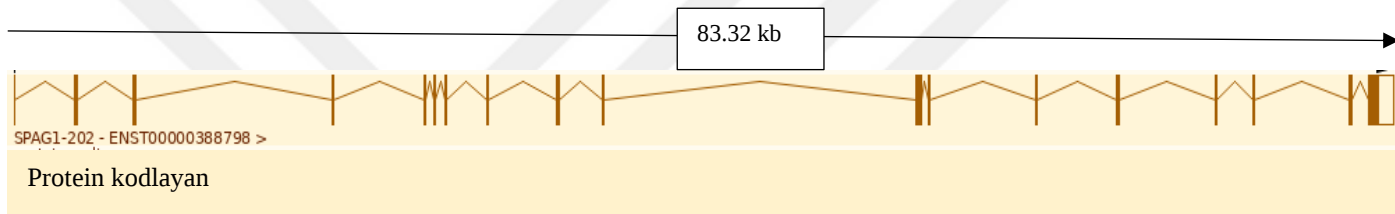


Şekil 2-18: SP1 Geni (134)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.3.7. SPAG1

SPAG1 (Sperm Associated Antigen 1), genomik lokasyonu 8. kromozom olan ve spermatogenez ve döllenme süreçlerinde görevli proteini kodlayan bir gendir. Çoğu

zaman sebebi bilinmeyen kısırlık vakalarıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (135). Bunun yanı sıra, Pankreatik adenokarsinom dokularında normal dokularla karşılaştırıldığında artan *SPAG1* ekspresyonu gözlemlenmiş ve artan gen ekspresyonu kötü prognoz ve kanser hücre hareketliliğine bağlı erken metastaz ile ilişkilendirilmiştir (136). Prostat kanseri için de onkogen davranışlar gösterdiği gözlemlenen *SPAG1* geninin, ekspresyon artışı yoluyla düşük sağ kalım oranına sebep olduğu belirlenmiştir (137). Adenokarsinom ve Prostat kanseri gibi kanser türlerinde olduğu gibi AML ile ilgili araştırmalarda da, artan gen ekspresyonu kötü prognoz, ağır hastalık seyri ve düşük sağ kalım oranı ile ilişkilendirilmiş, sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında AML hücrelerinde anlamlı *SPAG1* ekspresyon artışı gözlemlenmiştir (138).



Şekil 2-19: SPAG1 Geni (139)’dan değiştirilerek alınmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. HL-60 ve NB4 Hücre Hatları Temini

HL-60 hücreleri TC Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ŞAP Enstitüsünden, NB4 hücre hattı ise İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden (ASDETAE) temin edilmiştir.

İki hücre hattı da %10 FBS ve %1 Penicillin-Streptomycin içeren RPMI-1640 besiyeri ile 37°C, %5 CO₂ inkübasyon koşullarında çoğaltılmıştır. %70 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanmış ve bir kısmı sonraki aşamalarda kullanılmak üzere %10 DMSO içeren besiyeri ile birlikte -80°C'de saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzeme

Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen proje için sağlanan parasal destek kapsamında talep edilen ve projede kullanılan kalemler Tablo 3-1'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan tüketime yönelik malzemeler ve kullanım amaçları

Adı	Kullanım Yeri
Steril Pastör Pipet	Hücre Kültürü İşlemleri
RPMI 1640	
Penicillin-Streptomycin	
FBS	
PBS	
DMSO	
TaqMan Reverse Transcriptase	Transfeksiyon ve validasyon işlemleri
TaqMan Universal Master Mix	
TaqMan miRNA Assay/ miR-638-5p	
TaqMan miRNA Assay/RNU43	
miRNA Mimik/miR-638-5p	
miRNA Mimik/Non-Targeting miRNA	
Lipofectamine 2000	
Opti-MEM™	
TRIzol Reagent (100 ML)	RNA izolasyon işlemleri
İzopropanol	
Chloroform (100 ML)	

%70 Ethanol	Gen ekspresyonu araştırılması sürecinde cDNA sentezi ve qRT-PZR işlemleri
RNAse-free su	
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPZR Supermix UNG	
SCRIPT cDNA Synthesis Kit	

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Projede İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı'nın altyapı olanaklarından yararlanılmıştır. Çalışma süresince projede kullanılan araç ve ekipman Tablo 3-2'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3-2: Çalışmada kullanılan cihazlar, araçlar ve kullanım amaçları

Ekipman Adı, Türü, Modeli	Projede Kullanım Amacı
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç hastalıkları AD, Tıbbi Genetik BD Laboratuvarları	Projenin deneylerinin gerçekleştirileceği yerdir
CO ₂ Inkübatör- Nüve	Proje süresince hücre hatlarının çoğaltılması için hücre ekiminde kullanılacaktır.
Jel belgelendirme sistemi/Vilber Lourmat	PZR ürünlerini görüntülemek ve kaydetmek için kullanılacaktır.
Gerçek-Zamanlı PZR(LightCycler480)-Roche	qRT-PZR deneylerinin yapılması için kullanılacaktır.
Soğutmalı Mikrosantrifüj- Hettich Rotina 420R	RNA izolasyonu gerçekleştirmek için kullanılacaktır.
Elektroforez aletleri, güç kaynakları/Thermo	RNA ürünlerinde kalite tespiti için kullanılacaktır.
Spektrofotometre- NanoDrop-Thermo Sci	Ayrıştırılan RNA örneklerinin derişimlerinin ve saflıklarının belirlenmesi için kullanılacaktır.
Isı döngü cihazı (Thermal Cycler)-BioRad	cDNA sentezi ve PZR için kullanılacaktır.
Microplate Reader- BioTek	Hücre proliferasyonu ve apoptoz deneyleri için kullanılacaktır.
(-20) Derin dondurucu-Vestel	Kullanılacak reaktif, solüsyon, kit ve örneklerin saklanması için kullanılacaktır.
(-80) Derin dondurucu-WiseCryo	Kullanılacak RNA örneklerinin, hücre stoklarının ve bazı reaktiflerin uzun süreli saklanması için kullanılacaktır.
Çok Kanallı Mikropipet-Thermo Sci.	Çok örnekli reaksiyonların yapılması için kullanılacaktır.
İnvert Mikroskop-Olympus	Hücre kültürü deneylerinde hücre görüntüleme için kullanılacaktır.
Laminar güvenlik kabini-Fagus	İn vitro deneylerin uygulanması ve qRT-PZR için gerekli amplifikasyon

	reaksiyonlarının kurulması için kullanılacaktır.
--	--

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücrelerin Çoğaltılarak Pasajlanması

HL-60 ve NB-4 hücre hatları %10 FBS ve %1 Penicillin-Streptomycin içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılarak çoğaltıldı. Hücreler çoğaltma aşamasında, 37°C olan ve %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edildi ve gerektiğinde (%70 yoğunluk) pasajlandı.

3.2.2. Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Yeterince çoğaltılan hücreler, diğer deney aşamalarında kullanılmak üzere %10 DMSO içeren RPMI-1640 besiyeri solüsyonu içerisinde -80°C’de dondurularak saklandı.

3.2.3. Hücre Hatlarına miR-638-5p ve Non-Targeting miRNA Mimik Transfeksiyonu

Mimik transfeksiyonu için 5nmol miR-638-5p mimik 500 µL su kullanılarak çözüldü. Ekim işleminde 6 kuyucuklu plateler kullanıldı ve her bir kuyuya 4x10⁵ hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücre çoğaltma aşamasından sonra toplanan hücrelerin sayımı Thoma Lamı ve Tripin Blue boyası kullanılarak gerçekleştirildi. Sayım için 20 µL hücre ve 20 µL Tripin Blue (1:1) kullanıldı. Sayımı yapılan HL-60 hücrelerinden her bir kuyucukta 4x10⁵ hücre olması amacıyla 1 kuyucuğa 100 µL hücre ekildi. Sayımı yapılan NB4 hücrelerinden her bir kuyucukta 4x10⁵ hücre olması amacıyla 1 kuyucuğa 266 µL hücre ekildi. Ekim sırasında antibiyotik eklenmemiş %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri kullanıldı.

Ekim yapıldıktan 24 saat sonra deney grubuna, Lipofectamine 2000 reagent protokolüne göre miR-638-5p mimik transfeksiyonu ve non targeting miRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi. İşlemler HL-60 ve NB4 hücre hatları için aynı adımları içerecek şekilde tekrarlanmıştır. Transfeksiyon adımı 1(HL-60) hücre hattı için gerçekleştirilen işlemler sırasıyla aşağıdaki gibidir;

Bir tüpe 30pmol olacak şekilde Opti-MEM ve miR-638-5p/nt miRNA eklendi.



Ayrı bir tüpe yoğunluk 30 pmol olacak şekilde Lipofectamine 2000 reagent ve Opti-MEM eklendi.



5 dakika beklendi.



2 tüp karıştırıldıktan sonra 20 dakika beklendi. Bekleme aşamasında hücreler 24 saat önce ekildikleri 6 kuyucuklu plate üzerinden toplandı ve besiyeri değişimi yapıldı.



6 kuyucuklu plate'in 2 kuyucuğuna transfeksiyon için 1 ml antibiyotik içermeyen besiyeri ve 1 ml hücre ekildi.

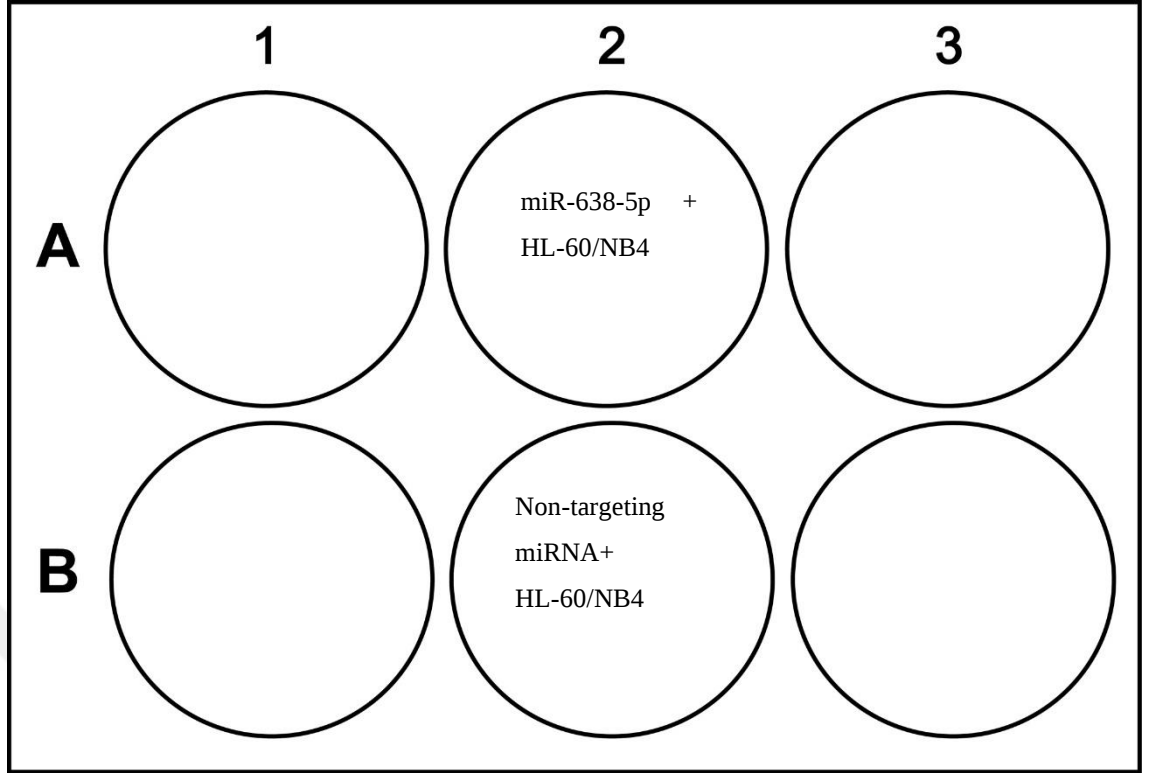


Hücre ekiminden sonra Transfeksiyon işlemi için birleştirilen Lipofectamine 2000 reagent, Opti-MEM ve miRNA mimik içerek karışım Şekil 3-1'te görülen 6 kuyucuklu plate'in A-2 kuyucuğuna eklendi.



HL-60 hücrelerine yapılan transfeksiyon işlemi yapılan kuyucuklar Şekil 3-1'de görüldüğü gibidir. 24 ve 48 saat sonra ölçüm yapılmak üzere örnekler duplike çalışıldı.

Transfeksiyon sonrası hücreler gen ekspresyon incelemeleri için 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saat sonra hücreler toplandı ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası her hücre pelleti üzerine 1 mL TRIzol Reagent eklendi. Daha sonra RNA izolasyonunda kullanılmak üzere toplanan hücreler TRIzol solüsyonu içerisinde -80°C'de saklandı.



Şekil 3-1: HL-60/NB4 hücrelerine mimik transfeksiyonu için 6 kuyucuklu plate tasarımı.

3.2.4. Hücrelerden RNA İzolasyonu

TRIzol (MRC Inc) kullanılarak miR-638-5p ve non-targeting miRNA transfeksiyonu gerçekleştirilen hücrelerden 24 saat sonra total RNA izolasyonu yapıldı. Üretici firma protokolüne uygun olarak RNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı;

1. Falcon tüplerde bulunan hücreler 5 dk 1500 rpm santifüj ile muamele edildikten sonra pellet üzerine 1 mL TRIzol Reagent eklenerek hücreler çözdürüldü.
2. Pellet ependorfa aktarıldıktan sonra üzerine 100 µL kloroform eklendi.
3. 10 dakika bekledikten sonra 13.000 rpm ve 4°C'de 15 dakika santifüj gerçekleştirildi.
4. Santifüj sonrası RNA'nın bulunduğu renksiz üst sıvı kısım ayrı bir ependorfa alındı ve üzerine 500 µL soğuk isopropanol eklendi, tüp 15 dakika buzda inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonrası 13.000 rpm ve 4°C’de 15 dakika santifüj gerçekleştirildi.
6. RNA pellet olarak çöktüğü için süpernatant kısmı atıldı ve pellet 500 µL soğuk ethanol kullanılarak tekrar çözüldü.
7. Karışım vortex kullanılarak karıştırıldıktan sonra 12.000 rpm ve 4°C’de 5 dakika santrifüj gerçekleştirildi.
8. Süpernatant atıldı ve RNA pelleti tüplerin ağzı açık bırakılarak 5-10 dakika kurutuldu.
9. Kuruyan ve ethanolenden arınan pellet 50 µL RNase-free su kullanılarak pipetaj yardımıyla çözüldü.

İzole edilen RNA’ların konsantrasyon ve saflık ölçümü için NanoDrop ND-200c (Thermo Fisher) spektrofotometre kullanıldı. RNA integrite kontrolü, jel elektroforez yöntemi kullanılarak yapıldı. İzole edilen RNA’lar çalışmanın gerekli aşamalarında kullanılmak üzere -80°C’de saklandı.

3.2.4.1. TaqMan Primer/Prob Sistemiyle cDNA Sentezi ve qRT-PZR Yapılarak Transfeksiyon Doğrulama Çalışması

HL-60 ve NB4 hücre hatlarında gerçekleşen transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için miR-638-5p’nin hücre hatları üzerinde ifade düzeyine bakılarak validasyon analizi yapıldı. Validasyon analizi için cDNA sentezi yapıldı ve LightCycler480(Roche) cihazı ile qRT-PZR yöntemi kullanıldı. qRT-PZR deneylerinde TaqMan Universal Master Mix(Thermo Fisher) kiti ve TaqMan miRNA problemleri (Thermo Fisher) ile TaqMan kontrol problemleri(RNU43) kullanıldı.

- Validasyon analizi için kullanılacak cDNA sentezinde Tablo 3-3’te görüldüğü gibi miR-638-5p transfeksiyonu, nt transfeksiyon ve RNU43 için HL-60 ve NB4 için 3’er ayrı örnek hazırlandı.

Tablo 3-3: cDNA sentezi için kullanılan sarf malzemeler ve miktarları

	x (µL)
dH₂O	4,16
10x Reverse Transcription buffer	1,5
10 mM dNTP	0,15
RT enzim (50 U/µL)	1
RNase inhibitör (20U/µL)	0,19
TaqMan® MicroRNA Primer	3
Template RNA (15ng/mL)	5

- Tüpler 5 dakika buzda bekletildi.
- ThermalCycler cihazı kullanılarak cDNA sentezi sonrası RT-PZR analizi için TaqMan protokolüne uygun olarak Tablo 3-4'teki malzemeler kullanılarak qRT-PZR işlemleri ve miR-638-5p ekspresyon incelemesi gerçekleştirildi.

Tablo 3-4: qRT-PZR işleminde kullanılan malzemeler

	Miktar
dH₂O	7 µL
TaqMan® Universal Master Mix II	10 µL
TaqMan® MicroRNA Prob (RNU43)	1 µL
cDNA	2 µL

3.2.5. miR-638-5p'nin Hücresel Süreçlere Etkisinin Araştırılması

3.2.5.1. Hücre Ölümünün (Apoptozun) Değerlendirilmesi İçin Kaspas-3 Deneyi

Transfeksiyon sonrası 24 saat inkübe edilen NB4 hücreleri, miR-638-5p ve nt miRNA transfeksiyonunun apoptoza etkilerini araştırmak üzere toplanan hücrelere Tablo 3-5' teki malzemeler belirtilen miktarlarda kullanılmıştır.

Tablo 3-5: Apoptoz ölçümünde kullanılan malzemeler

Solüsyon	Miktar
1x Washing Buffer	400 µL
Lysis Buffer	1 µL
Tetramethyl-benzidine	100 µL
Reaksiyon durdurucu	100 µL
dH ₂ O	140 µL

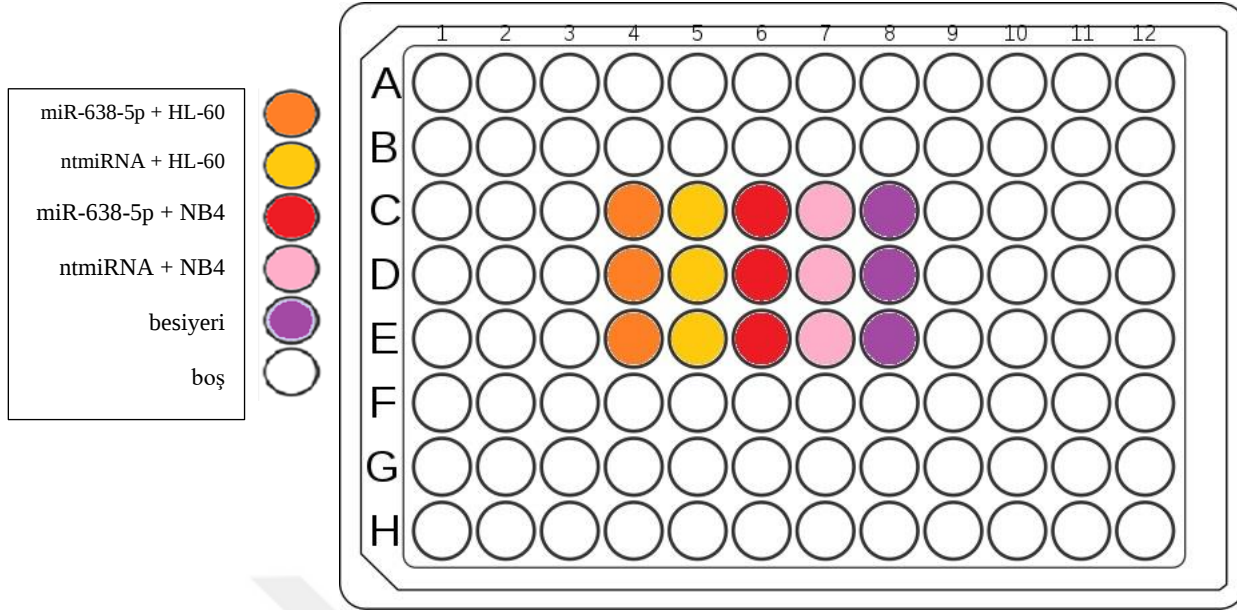
Uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

- Santrifüj sonrası PBS ile yıkanan hücreler tekrar santrifüj edildi ve pellet kısmıyla işleme devam edildi.
- Pellet kısmına PBS ile yıkama işlemi tekrarlandı.
- ELISA hücre ölümü saptama kiti (Human Caspase 3 Instant ELISA Kit) protokolüne uygun olarak pellet 1 mL lysis buffer kullanılarak çözdürüldü ve 60 dakika çalkalayıcı (EcoTech, BioTechnology) ile birlikte oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Santrifüj (15 dakika, 1000 xg) sonrası parçalanmış hücreler ilerleyen aşamalarda kullanılmak üzere -80 °C’de saklandı.
- Mikro ELISA plakasındaki kuyucuklara 3 tekrarlı olması planlanarak hem deney hem de kontrol örnekleri için 140 µL dH₂O eklendi.
- Kuyucuklara 10 µL önceden hazırlanan ve saklanan hücre lizatları eklendi.
- Hazırlanan plaka cover ile örtülerek oda sıcaklığında ve çalkalayıcı ile inkübe edildi.
- Yıkama işlemi kit protokolüne uygun olarak ve 1x Washing Buffer (+4°C) kullanılarak gerçekleştirildi.

- Tüm kuyulardaki bileşenler tamamen kuruduktan sonra kuyucuklara 100 μ L Tetramethyl-benzidine (TMB) eklendi ve 20 dakika karanlık koşullarda inkübasyon süresi tamamlandı.
- MULTISKAN FC mikro plaka okuyucu (ThermoFisher Sci.) kullanılarak 620 nm’de Standart 1 kuyucuğunun OD değerinin ~ 0.9 ’a kadar yükselişi takip edildi.
- Beklenen değere ulaşan kuyucuklara reaksiyon durdurucu eklenerek apoptoz kaynaklı üretilen nükleozomal oluşum miktarı, 405 nm’de ölçüldü.

3.2.5.2. Hücre Canlılığının (Proliferasyon) Değerlendirilmesi için WST8 Deneyi

miR-638-5p mimiği ve non-targeting miRNA transfeksiyonu yapılan hücrelerin proliferasyon değişimlerini incelemek amacıyla WST8 (Sigma) yöntemi kullanıldı. Sayımı yapılan HL-60 hücrelerinden 96 kuyucuklu platelere her bir kuyucuğa 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 10 μ L hücre canlılığı deteksiyon boyası (cell viability detection reagent) eklendi. 48 ve 72. saatlerde ölçüm yapabilmek için hücre ekimi 3 tekrarlı olacak şekilde 2 farklı 96 kuyucuklu plate üzerine tasarlandı. Ekimi tamamlanan örnek plate Şekil 3-2’deki gibidir.



Şekil 3-2: Hücre canlılığı ölçümü için 96 kuyucuklu plate'e ekilen hücreler.

Hücre ekiminden sonra 37 °C ve %5 CO₂ ile inkübe 24 saat inkübe edilen hücrelere miR-638-5p ve non-targeting miRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi. Hücrelerin proliferasyon değişimini değerlendirmek üzere 48 ve 72. Saatlerde 450 nm'de ölçüm yapabilen MULTISKAN FC micro plate (ThermoFisher Sci.) cihaz protokolüne uygun olarak ölçüldü.

3.2.5.3. İn Silico Yöntemlerle miR-638-5p'nin Potansiyel Hedef Genlerinin ve Primerlerin Belirlenmesi

Potansiyel hedef genlerin seçiminde literatürde AML ile ilişkilendirilen fakat daha önce AML hücrelerinde miR-638-5p aracılığıyla incelenmemiş genler seçilmiştir. Genlerin miR-638-5p'nin hedef genlerinden olması hedeflendiği için Targetscan ve miRTarBase sitelerinden yardım alınmıştır.

Literatürden seçilen primer çiftleri (Tablo 3-6) SNPCheck ve UCSC *in silico* PZR programları yardımıyla kontrol edildi, erime sıcaklık değerlerinin birbirlerine yakın olmasına ve SNP içermemesine dikkat edildi. Seçilen primerlerin genomda hedeflenen genler dışında non-spesifik bağlanmalar yapıp yapmadığı BLAST yardımıyla kontrol edildi.

Tablo 3-6: qRT-PZR işlemlerinde kullanılan primer dizileri

	Primer Dizisi	Baz Sayısı	Tm	Referans
<i>PIM1-F</i>	5'- CCGTCTACACGGACTTCGAT-3'	20	60.1	(140)
<i>PIM1-R</i>	5'- CTGGCCCCTGATGATCTCTT-3'	20	61.5	(140)
<i>PGK1-F</i>	5'-TCACTCGGGCTAAGCAGATT-3	20	60	(141)
<i>PGK1-R</i>	5'-CAGTGCTCACATGGCTGACT-3'	20	60	(141)
<i>MeCP2-F</i>	5'-ACTTCTGGCCCTGGTTAGGT-3'	20	60	(142)
<i>MeCP2-R</i>	5'-CCGTGACCGAGAGAGTTAGC-3'	20	60	(142)
<i>MEF2C-F</i>	5'-GCACCAACAAGCTGTTCCAG-3'	20	61.8	(143)
<i>MEF2C-R</i>	5'-TGTCTGAGTTTGTCCGGCTC-3'	20	61.4	(143)
<i>HOXA9-F</i>	5'-CCACGCTTGACACTCACACT-3'	20	59.9	(144)
<i>HOXA9-R</i>	5'-TCGTCTTTTGCTCGGTCTTT-3'	20	60	(144)
<i>SP1-F</i>	5'-TTGAAAAAGGAGTTGGTGGC-3'	20	60.1	(145)
<i>SP1-R</i>	5'-TGCTGGTTCTGTAAGTTGGG-3'	20	58.8	(145)
<i>SPAG1-F</i>	5'-CCGCAGTGGTATAGCAACAG-3'	20	59.4	(146)
<i>SPAG1-R</i>	5'-GGCTTTCACGTTCCCATCAG-3'	20	62.9	(146)
<i>β-actin-F</i>	5'-GCCTCGCCTTTGCCGATC-3'	18	66.5	(147)
<i>β-actin-R</i>	5'-CCCACGATGGAGGGGAAG-3'	18	63.8	(147)

3.2.5.4. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti İçin cDNA Sentez İşlemlerinin yapılması

Transfeksiyon sonrası RNA izolasyonu yapılan HL-60 ve NB4 hücrelerinden cDNA sentezi SCRIPT Reverse Transcriptase (BioRad) ve Oligo-dT Primer, RNA (HL-60 için total 300 ng, NB4 için total 500 ng) ve Script cDNA sentez kiti (BioRad) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentezi aşamasında uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir;

1. HL-60 miR-638-5p ve non targeting transfeksiyon örnekleri, NB4 miR-638-5p ve non targeting transfeksiyon örnekleri için (n=4) RNA template içeren Primer karışımının hazırlanması aşamasında Tablo 3-7'de görülen bileşenler 1 örnek için belirtilen miktarlarda nükleaz içermeyen bir tüpte birleştirildi.

Tablo 3-7: Primer karışımı için kullanılan malzemeler

Bileşen	Miktar (μL)
RNase-free water	Total hacmi 10 μL 'ye tamamlayacak şekilde değişken
RNA template	Son RNA konsantrasyonu 10 pg - 5 μg olacak şekilde değişken
Oligo-dT Primer (50 pmol)	0.5 μL

- İlk adımda hazırlanan karışım pipetaj yardımıyla karıştırıldıktan sonra denatürasyon için 65-70 °C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edildikten sonra primerlerin bağlanmasını sağlamak için buz üzerine alındı.
- Reaksiyon karışımını hazırlamak için Tablo 3-8'de görülen bileşenler belirtilen miktarlarda ayrı bir nükleaz içermeyen tüpte birleştirildi.

Tablo 3-8: Reaksiyon karışımında kullanılan malzemeler

Bileşen	Miktar
RNase-free water	Total hacmi 10 μL 'ye tamamlayacak şekilde değişken
SCRIPT RT Buffer complete (5x)	4 μL
dNTP Mix (10 mM)	1 μL
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5 μL
SCRIPT Reverse Transcriptase (200 U/μL)	0.5 μL

- 10 μL RNA template/Primer karışımı ile 10 μL reaksiyon karışımı birleştirilerek buz üzerinde pipetaj yapıldı.
- Her örnek için 20 μL reaksiyon karışımı elde edildi.
- Tüpler PZR cihazına yüklendi ve Tablo 3-9'da görülen protokole uygun olarak işleme alındı ve cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3-9: cDNA sentezi için uygulanan PZR protokolü

25°C	5 dakika
46°C	20 dakika
95°C	1 dakika
4°C	∞

3.2.5.5. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti için qRT-PZR İşlemlerinin Yapılması

qRT-PZR işlemlerinde normalizasyon için β -aktin geni kullanıldı. Üretici firma protokolüne uygun olarak EvaGreen qPZR Supermix kullanıldı. miR-638-5p'nin aday hedef genleri olarak seçilen 7 genin ifade düzeyi analizleri için Tablo 3-6'daki primer çiftleri kullanıldı.

qRT-PZR işlemlerinde kullanılmak üzere liyofilize haldeki primerler, stok konsantrasyonu 100 μ M olacak şekilde nükleaz içermeyen su kullanılarak çözüldü.

7. Elde edilen 4 farklı cDNA örneğinin (HL-60 miR-638-5p, HL-60 nt, NB4 miR-638-5p, NB4 nt) qRT-PZR işlemleri için EvaGreen boya ve 10 μ M olacak şekilde seyreltilen primer çiftleri kullanıldı.
8. EvaGreen protokolüne uygun olarak incelenecek her genin ekspresyon analizi için Tablo 3-10'da görülen karışım hazırlandı.

Tablo 3-10:qRT-PZR işlemleri için hazırlanan karışım

	x (μ L)	10x (μ L)
qRT-PZR mix (5X HOT FIREPol EvaGreen qPZR Supermix)	4	40
Forward Primer (10pmol/ μ L)	0,4	4
Reverse Primer (10pmol/ μ L)	0,4	4
dH2O	13,2	132
cDNA	2	20

9. Hazırlanan mikslar 96 kuyucuklu plate'e 2 tekrarlı olacak şekilde dağıtıldı.
10. Karışım eklendikten sonra ilgili kuyucuklara 2'şer μL cDNA eklendi ve toplam hacim 20 μL 'ye tamamlandı.
11. Plate seal kullanılarak kapatıldıktan sonra çok kısa süreli santrifüj edildi. Ardından LightCycler480 (Roche) cihazına yerleştirilerek ekspresyon analizi gerçekleştirildi.

3.2.6. İstatiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatiksel analizleri için SPSS 28 yazılımı kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İstatiksel anlamlılık değerlendirmesi için Student's t test kullanıldı ve test sonucuna göre p değeri 0,05'ten küçük olan veriler anlamlı olarak kabul edildi. Deneyler 2 veya 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. qRT-PZR sonuçlarının rölatif kantitasyon analizi için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanıldı. Bulguların grafik çizimleri ve diğer figürlerin oluşturulmasında başta GraphPad Prism 9.3 yazılımı olmak üzere Paint programı ve Microsoft Excel yazılımından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerden RNA Sentezi

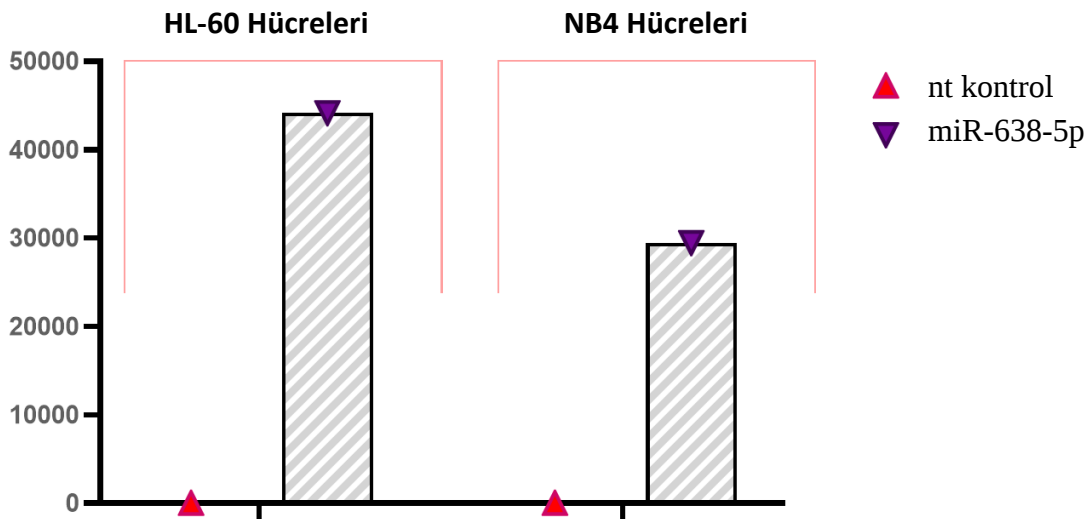
TRIzol yöntemi kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilen miRr-638-5p ve nt-miRNA transfekte edilmiş hücrelerin NanoDrop ND-200c (Thermo Fisher) spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülen konsantrasyon ve saflık ölçümlerine ait değerler Tablo 4-1’de belirtilmiştir.

Tablo 4-1: NanoDrop ND-200c (Thermo Fisher) spektrofotometre bulguları.

	Konsantrasyon	Saflık
HL-60 / miR-638-5p	36 ng/ μ L	1,85
HL-60 / nt miRNA	89 ng/ μ L	1,87
NB4 / miR-638-5p	140 ng/ μ L	1,81
NB4 / nt miRNA	82 ng/ μ L	1,80

4.2. Transfeksiyon Validasyonu

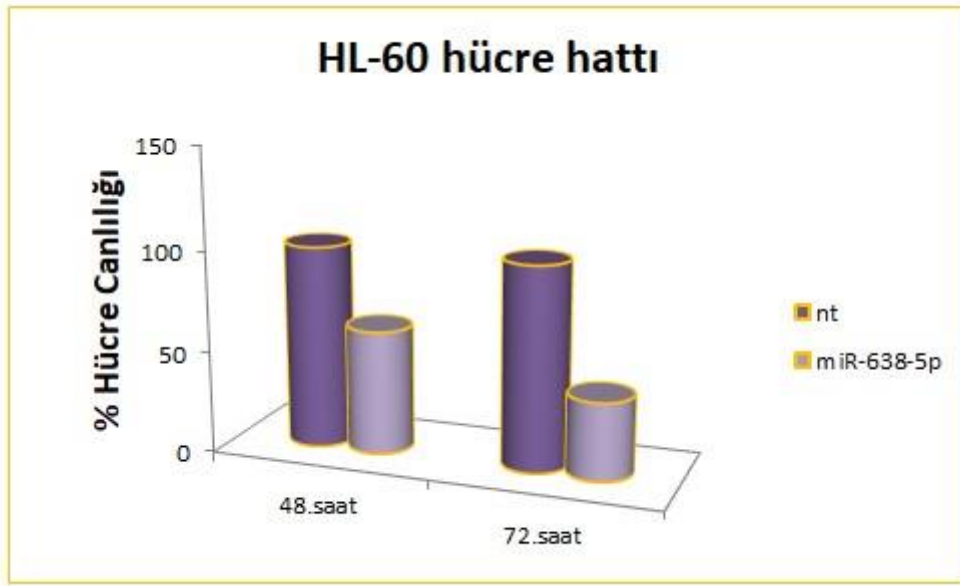
qRT-PZR yöntemiyle inceleme sonucunda transfekte edilen hücrelerde, kontrol hücrelerine göre anlamlı ölçüde artan miR-638-5p seviyeleri transfeksiyonun gerçekleştiğini doğrulamıştır (Şekil 4-1).



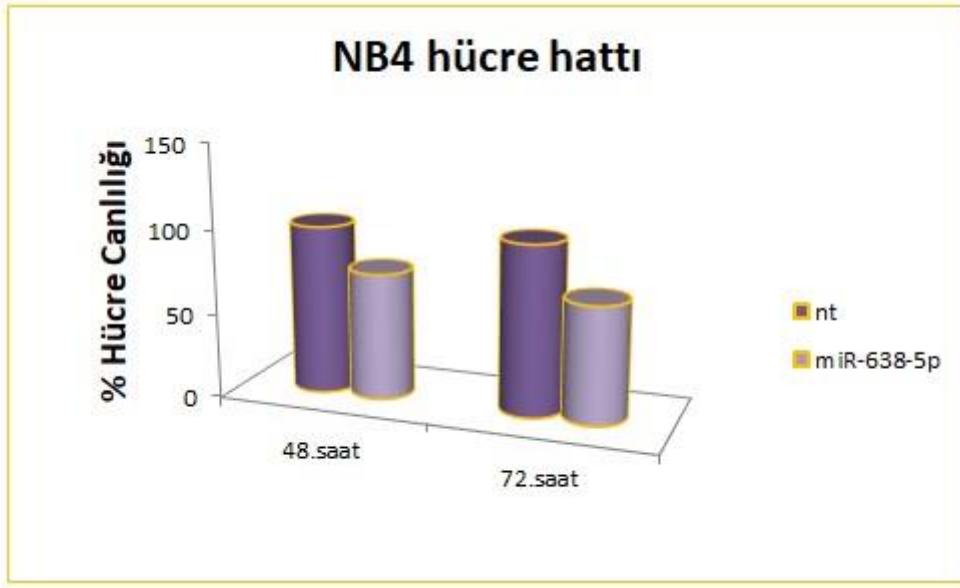
Şekil 4-1: HL-60 ve NB4 hücrelerinde miR-638-5p mimik transfeksiyonunun doğrulanması

4.3. WST8 Deneyi ile Hücre Canlılığı Ölçümü

WST-8 yöntemiyle 48 ve 72. saatlerde incelenen hücrelerde, hem HL-60 ($p=0,033$ ve $p=0,032$) hem de NB4 ($p=0,028$ ve $p=0,027$) hücre hattında hücre canlılığının anlamlı ölçüde baskılandığı tespit edilmiştir (Şekil 4-3).



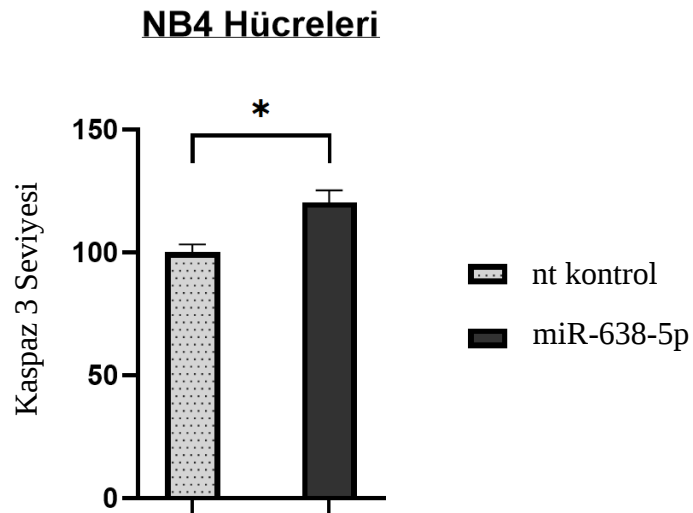
Şekil 4-2: HL-60 hücreleri için proliferasyon bulguları (*: $p<0,05$)



Şekil 4-3: HL-60 hücreleri için proliferasyon bulguları (*: $p < 0,05$)

4.4. Kaspaz 3 Deneyi ile Hücre Ölümü Ölçümü

NB4 hücrelerine miR-638-5p transfeksiyonu sonrasında Kaspaz 3 miktarının kontrol grubuna göre istatistiki düzeyde anlamlı artış gösterdiği gözlemlenmiştir ($p=0,002$) (Şekil 4-4).

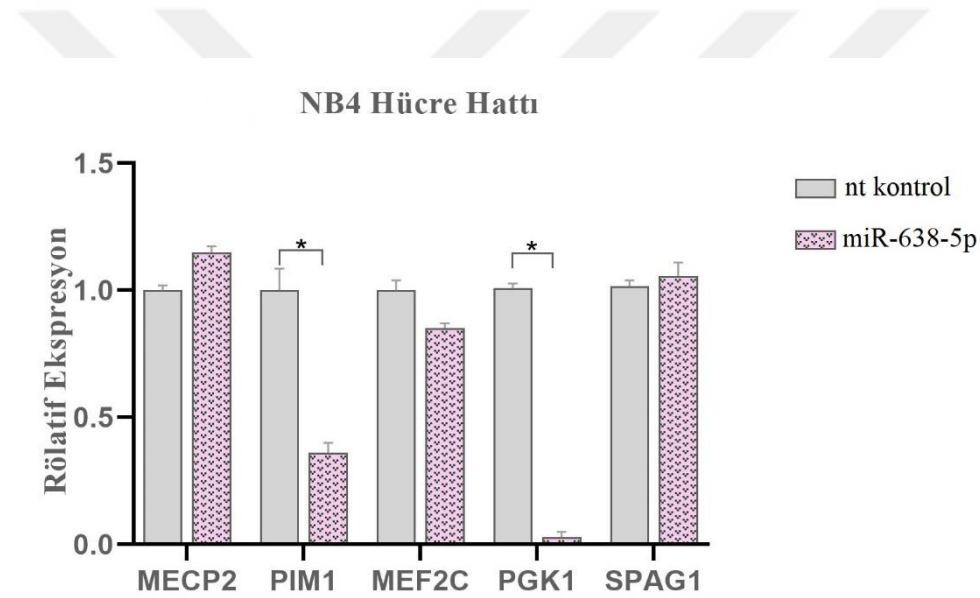


Şekil 4-4: NB4 hücre hattı için Human Caspase 3 Instant ELISA Kiti ile elde edilen apoptoz bulguları (*: $p < 0,05$)

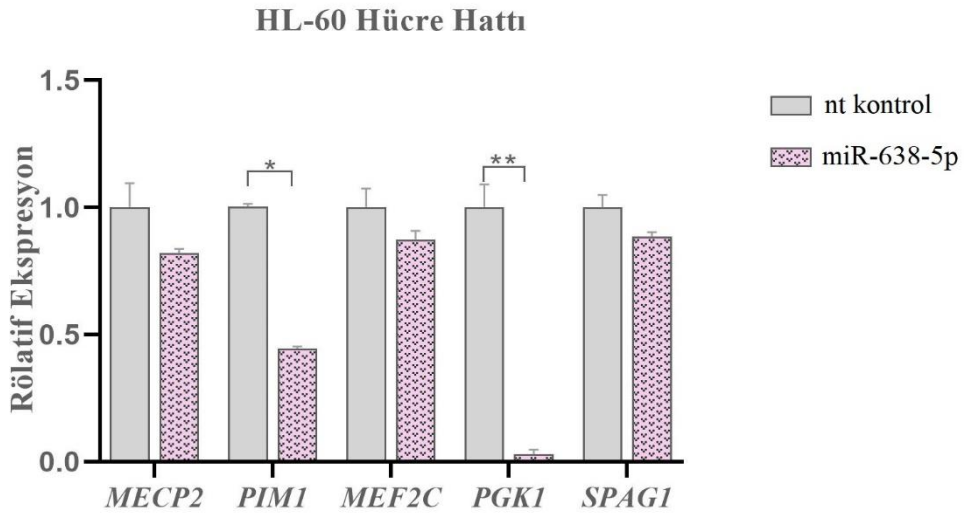
4.5. qRT-PZR Deneyi ile Gen Ekspresyon Seviyelerinin Tespiti

PIM1 ve PGK1 gen ifadelerinin miR-638-5p transfekte edilen grupta kontrol gruba kıyasla azaldığı hem HL-60 ($p=0,019$ ve $p=0,003$) hem de NB4 ($p=0,01$ ve $p=0,016$) hücre hattında tespit edildi. Buna karşın MECP2, MEF2C ve SPAG1 genlerinin ifadelerinin istatistiki olarak anlamlı değişim göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4-5, Şekil 4-6).

HOXA9 ve SP1 genlerinin ifadelerinin yeterli Ct seviyesinde ($Ct < 35$) tespit edilememesi nedeniyle istatistiki veri analizi yapılamadı.



Şekil 4-5: NB4 hücrelerinde rölatif ekspresyon bulguları (*: $p < 0,05$)



Şekil 4-6: HL-60 hücrelerinde rölatif ekspresyon bulguları (*: $p<0,05$, **: $p<0,01$)

5. TARTIŞMA

Akut Myeloid Lösemi blast hücrelerinin yetersiz olgunlaşmasıyla karakterize olan ve yetişkinlerde en sık görülen lösemi çeşididir. Son yıllardaki araştırmalara ve gelişmelere rağmen hastalığın prognozuyla ilgili bilgiler yetersizdir ve tam şifa oranı hala %40'ın altındadır. Bu yüzden terapötik olarak yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (148).

MiRNA'lar gen ekspresyonunda görev alan, küçük ve kodlama yapmayan RNA'lardır. Hücre proliferasyonu, apoptozu, anjiyogenezi ve invazyonu gibi süreçlerde etkili olan miRNA'ların, tümör baskılayıcı genlerin veya onkogenlerin ekspresyonlarını etkileyerek kanserde patogenezele bağlantılı oldukları gösterilmiştir. Bazı kanser türlerinde ekspresyon bozukluklarıyla karakterize olan miRNA'lar bu kanserlerin tanı, prognoz ve tedavi süreçlerinde biyobelirteç özelliği taşımaları sebebiyle son yıllarda bu konuda araştırmalar artmıştır (85, 149).

AML'de Let-7b ve miR-223'nin, ekspresyon artışı, miR-128a ve miR-128b'nin ise anlatımının azaldığı belirlendiği için hem AML tanısı hem de AML'nin ALL'den ayırt edilmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilecekleri gösterilmiştir. Garzon ve arkadaşları AML'de fazla ekspresyon gösteren miR-20a, miR-25, miR-191, miR-199a, miR-199b'yi kötü prognoz ve düşük sağkalım oranıyla ilişkilendirmiştir (150). miR-22, miR-29 ve miR-34a gibi tümör baskılayıcı miRNA'lar AML hastalarında azalmış ekspresyon göstermiş ve azalan ekspresyon düşük sağkalım oranıyla ilişkilendirilmiştir (151). Wang ve arkadaşları AML hastalarında miR-29a ve miR-142-3p'nin anlatımının azaldığını hem mikroarray hem RT-PZR yöntemleriyle göstermiştir. Jiang ve arkadaşları bir diğer çalışmada artan miR-125b ekspresyonunun AML ile ilişkili olduğunu gözlemlemiş, ayrıca bu artışın artan relaps oranı, düşük sağkalım oranı ve kötü prognozla da ilişkili olması sebebiyle miR-125b'nin biyobelirteç potansiyeli taşıdığını bildirmişlerdir (152).

miR-638-5p birçok farklı kanser türüyle ilişkilendirilen ve kanser oluşum sürecinde görev aldığı bildirilen miRNA'lardandır. Meme kanseri (153), akciğer kanseri (154), melanoma (155) gibi kanserlerde tümör oluşumunu desteklediği saptanan miR-638-5p, lösemi (156), mide kanseri (103), kolorektal kanser (157) gibi türlerde tümör baskılayıcı özellik göstermiştir. Meme kanseri ve osteosarkomda ise farklı genleri hedef alarak hem tümör oluşumunu destekleyen (onkojenik) hem tümör oluşumunu baskılayıcı (tümör supressor) olarak davranabilmektedir (158). miR-638-5p ve AML ilişkisini

inceleyen çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birinde primer miyeloid hücrelerinde miR-638-5p ifadesinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada miR-638-5p'nin ektopik ekspresyonunun kanser hücre proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir. Bu nedenle de miR-638-5p'nin AML'de tanı ile tedavi biyobelirteci olma yönünde potansiyel taşıdığı sonucuna ulaşılmıştır (14). Bir diğer çalışmada ise miR-638-5p, lösemili olguların kemik iliği ve periferik kan örneklerinde RT-PZR yöntemiyle miR-638-5p seviyeleri incelenmiş ve sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında APL hücrelerinde azalmış miR-638-5p seviyesi gözlenmiş ve miR-638-5p'nin tanı için kullanılabilecek önemli bir biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca tedavi sonrası remisyon döneminde tekrar incelenen miR-638-5p ekspresyon seviyesi, tedavide öncesine göre önemli oranda artış gösterdiği için miR-638-5p'nin APL'de terapötik potansiyel taşıdığı da bildirilmiştir (10).

Bu tez projesinde miR-638-5p transfeksiyonunun, hem NB4 hem de HL-60 hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, NB4 hücrelerinde yapılan apoptoz ölçümünde elde edilen veriyle doğrulanmıştır. Elde edilen veriler literatür verileriyle uyumlu olup, miR-638-5p'nin AML hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı ve apoptozu arttırdığı gözlenmiş ve AML üzerinde tümör supressör etki gösterdiği doğrulanmıştır.

Transfeksiyon sonrası RT-PZR ile ölçülen gen ekspresyonu sonuçlarına göre incelenen genlerden *PIM1* ve *PGK1* genlerinin ifadesinde NB4 ve HL-60 hücre hatlarının ikisinde de miR-638-5p transfekte edilen grupta kontrol gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Öte yandan potansiyel hedef gen olarak seçilen *MECP2*, *MEF2C*, *SPAG1*, *HOXA9* ve *SP1* genlerinin ifadesinde ise iki hücre hattında da anlamlı değişim gözlenmemiştir.

MECP2 ve *MEF2C* genlerinin sırasıyla mide kanseri (159), endometrial kanser (11), kanserler türlerinde miR-638-5p tarafından hedeflenerek kanser patogeneze katkı sağladıkları bildirilmiştir. *SPAG1* geninin de meme kanseri ve pankreas kanserinde patogeneze katkıda bulunduğu (160) ve Sertoli hücrelerinde miR-638-5p'nin hedef geni olduğu ve proliferasyonu azaltıp artan apoptozu yol açtığı gözlemlenmiştir (161). Bu onkogenlerin çalışmamızda ifadelerinin istatistiki olarak anlamlı değişim göstermediği belirlenmiştir. Farklı kanser türlerinde miR-638-5p'nin doğrudan hedefi olduğu bildirilmiş bu genlerin çalışmamızda AML'de hedeflenmiyor olmasının çeşitli nedenleri

olabilir. Örneğin; kanserin karmaşık moleküler yapısı düşünüldüğünde AML’de bu genlerin miR-638-5p dışında başka miRNA’lar tarafından kontrol ediliyor olabileceği akla gelmektedir. Yine bu genlerin ifade değişimi miRNA’lar dışında uzun kodlamayan RNA moleküllerinin kontrolü altında da olabilir. Çalışma bulgularımız, bu tip mekanizmalar açısından yeni araştırmaların yapılması yönünde literatüre katkı sağlayıcı özelliktedir.

HOXA9 ve *SP1* genlerinin qRT-PZR’de tespiti sağlanan ekspresyonunun yeterli eşik değer seviyesinde ($Ct < 35$) olmaması, bu genlerin hem HL-60 hem de NB4 hücrelerinde oldukça az ifade ediliyor olabileceğini düşündürmüştür. Total RNA miktarının arttırılmasıyla istatistiki analiz yapılabilecek seviyede Ct elde edilebileceği düşünülmüş ancak RNA yetersizliği nedeniyle bu işlem gerçekleştirilememiştir. Kanser ile ilişkili olduğu ve proto-onkogen olduğu bilinen *HOXA9* kanser prognozunda spesifik bir kanser türüyle ilişkilendirilmemiş ve protein fonksiyonu da embriyonik gelişim ile ilişkili olduğu için AML hücre hatlarında ekspresyonunun az olması mümkündür (162). Aynı şekilde *SP1* de kanser ile ilişkili genlerden olarak hücre büyümesi, farklılaşması, apoptozu gibi süreçlerde fonksiyon gösterdiği ve pankreas kanseri için prognostik biyobelirteç özelliği bulunduğu için AML ile de ilişkili olabileceği düşünülmüştür fakat elde edilen verilerin belirttiği şekilde NB4 ve HL-60 hücre hatlarında az ekspresyon göstermesi mümkündür (163).

PIM1 protoonkogen olarak çeşitli lösemi ve lenfoma türlerinde anlatımının arttığının tespit edilmesiyle kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (164). Solid tümörlerde de ekspresyon artışı gösteren *PIM1* daha önceki çalışmalarda mesane kanseri (165), mide kanseri (166) ve prostat kanserinde (167) kötü prognoz, artan metastaz oranı ve tedaviye verilen düşük yanıtla ilişkilendirilmiştir. Bu yüzden lösemi de dahil olmak üzere çeşitli kanserler için yeni bir tedavi ajanı olarak terapötik yaklaşımlarda ekspresyonunun azaltılması hedeflenmektedir. *PIM1* ekspresyonunun AML’de de artan ekspresyon gösterdiği bilinmektedir. Bu yüzden potansiyel terapötik ajanlarda hedef genlerden biri olmuştur (120). Literatürdeki verilere göre miR124-3p mimiği kullanılarak incelenen astrositoma hücrelerinde *PIM1* ekspresyonunun baskılandığı ve miR-124-3p’nin tümör baskılayıcı etkileri olduğu *in-vitro* olarak gözlemlenmiştir (168). Thomas ve arkadaşlarının çalışmasında, lenfoma ve kolon kanserinde miR-33a mimik transfeksiyonu sonrasında *PIM1* ekspresyonunda azalma gözlemlenmiş ve miR-33a’nın *PIM1* hedef geni

üzerinden terapötik ajan olma potansiyeli vurgulanmıştır (169). Pan ve arkadaşları azalan miR-370 ekspresyonunun hepatosellüler karsinom ile ilişkili olduğunu bildirmiş ve hepatosellüler karsinom hücre hatlarında miR-370 mimik transfeksiyonunun *PIM1*'i hedefleyerek ve ekspresyonunu azaltarak tümör baskılayıcı olarak hareket ettiğini gözlemlemiştir (170).

Literatürde çeşitli kanserlerde *PIM1* ve miR-638-5p ilişkisi ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin; Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *PIM1* ekspresyonu osteosarkoma hücrelerinde artmış şekilde gözlemlenmiş ve bu kanser türü için düşük sağ kalım oranıyla ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmış, artan miR-638-5p ekspresyonunun ise *PIM1* gen ekspresyonunu inhibe ederek tümör baskılayıcı rol oynadığı bildirilmiştir (119).

Bugüne kadar AML hücrelerinde *PIM1* geni miR-638-5p'nin hedef genlerinden biri olması açısından incelenmemiştir. Bu tez projesinde, miR-638-5p ekspresyon artışı AML hücrelerinde incelenmiş ve miR-638-5p'nin AML'de *PIM1* geni üzerinden tümör baskılayıcı rol oynama potansiyeli bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır.

PGK1, DNA tamir mekanizması ve anjiyogenez sürecinde görev aldığı için birçok kanser türüyle ilişkilendirilmiş bir protoonkogendir. Yumurtalık kanseri (171), beyin tümörleri (172, 173), hepatosellüler karsinom (174), meme kanseri (175), mide kanseri (176) ve prostat kanseri (177) gibi solid tümörlerde artan *PGK1* ekspresyonu tümör gelişimi ve metastazıyla ilişkilendirilmiştir (109). Hematolojik kanserlerde ve AML'de de artan ekspresyon göstermiş olan *PGK1* geni hücre farklılaşması, artan proliferasyon, kötü prognoz ve tedaviye verilen zayıf yanıtlar ile de ilişkili bulunmuştur. *PGK1* terapötik olarak hedeflenmesi uygun aday genlerden biri olmuştur (178).

Prostat kanseri dokularında incelenen *PGK1*, onkogen özellik gösterdiği doğrulandıktan sonra miR-215-5p'nin hedef genlerinden biri olduğu sonucuna ulaşılmış, artan miR-215-5p ekspresyonu, *PGK1* ekspresyonunu azaltma yoluyla terapötik açıdan potansiyel biyobelirteç özelliği taşıyabileceği bildirilmiştir (179). Meme kanseri hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada Liang ve arkadaşları, miR-16-1-3p'nin *PGK1* ekspresyonunu baskıladığını ve bu sayede tümör büyümesini de inhibe etme yönünde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (180). Kolorektal kanser hücrelerinde azalan ekspresyon ile karakterize olan miR-548c-5p, Ge ve arkadaşlarının çalışmasında incelenmiş ve lusiferaz aktivitesi sonuçlarına göre miR-548-5p'nin *PGK1*'in 3'UTR'sini

hedeflediği ve *PGK1* ekspresyon azalmasına sebep olarak kanser baskılayıcı özelliğe sahip olduğunu göstermiştir (181).

Kanser hücreleriyle yapılmayan fakat insan aort endotel hücrelerindeki bir çalışmada, Western Blot yöntemiyle protein düzeyinde incelenen *PGK1* ekspresyonunun miR-638-5p ekspresyonuyla ters şekilde ilişkili olduğu, artan miR-638-5p ekspresyonunun *PGK1*'i hedef alarak bu genin ifadesinin azalmasına sebep olduğu gösterilmiştir(182). Literatürde AML hücrelerinde miR-638-5p'nin potansiyel hedef genlerinden biri olarak *PGK1*'i araştıran çalışma ve ilgili veri bulunmamaktadır. Bu projede elde ettiğimiz veriler, insan aort endotel hücrelerinde yapılan çalışma bulgularındaki gibi miR-638-5p ekspresyonunun *PGK1*'i hedefleyerek ekspresyonunu baskıladığı yönündedir. Bu tez projesi AML hücrelerinde miR-638-5p/*PGK1* ilişkisini göstererek literatüre katkı sağlayacaktır. mRNA düzeyinde tespit edilen bu veriler ileri çalışmalarla doğrulama gerektirmektedir fakat bu sayede diğer kanser türlerinde terapötik potansiyel taşıdığı gösterilen miR-638-5p'nin AML hücrelerinde de *PGK1* geni üzerinden tümör baskılayıcı olarak rol oynayabileceği, gelecekteki çalışmalar için aday terapötik miRNA'lerden biri olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak çalışma kapsamında miR-638-5p transfeksiyonunun HL-60 ve NB4 olmak üzere iki farklı AML hücre hattında proliferasyonu azalttığı, apoptozu arttırdığı ve *PIM1* ile *PGK1* onkogenlerini hedefleyerek ekspresyonlarını azalttığı tespit edilmiştir. Tezde elde edilen bu sonuçların, gelecekte miR-638-5p'nin *PIM1* ve *PGK1* genlerini hedefleyerek AML'de terapötik biyobelirteç olma potansiyelini araştırarak ileri çalışmaların kurgulanması açısından oldukça önemli bir öncül veri niteliği taşımaktadır. İleri çalışma olarak, miR-638-5p transfeksiyonu sonrasında *PIM1* ve *PGK1*'e ait protein seviyelerinin western blot ile araştırılması sayılabilir. Lusiferaz reporter assay yöntemi ile miR-638-5p'nin bu genlerin 3' UTR kısmını hedefleyip hedeflemediğinin doğrulanması bir diğer yapılacak ileri incelemedir. Hücre hatlarında elde edilen bu bulguların AML hastalarının periferik kan/kemik iliği örneklerinde doğrulanması çok önemli olup hayvan deneylerinin kurgulanması için oldukça değerli bir veri niteliğindedir.

KAYNAKLAR

1. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med*. 2016;5(3).
2. de Rooij JD, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med*. 2015;4(1):127-49.
3. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-46.
4. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Rothlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2017;31(1):63-76.
5. Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(4):1202-7.
6. Mazumder S, Datta S, Ray JG, Chaudhuri K, Chatterjee R. Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiol*. 2019;58:137-45.
7. Zheng DH, Wang X, Lu LN, Chen DL, Chen JM, Lin FM, et al. MiR-638 serves as a tumor suppressor by targeting HOXA9 in glioma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(22):7798-806.
8. Shi M, Jiang Y, Yang L, Yan S, Wang YG, Lu XJ. Decreased levels of serum exosomal miR-638 predict poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem*. 2018;119(6):4711-6.
9. Li M, Wang J, Liu H. Downregulation of miR-638 promotes progression of breast cancer and is associated with prognosis of breast cancer patients. *Onco Targets Ther*. 2018;11:6871-7.
10. Bai Y, Chen C, Guo X, Ding T, Yang X, Yu J, et al. miR-638 in circulating leukaemia cells as a non-invasive biomarker in diagnosis, treatment response and MRD surveillance of acute promyelocytic leukaemia. *Cancer Biomark*. 2020;29(1):125-37.
11. Ni J, Liang S, Shan B, Tian W, Wang H, Ren Y. Methylation-associated silencing of miR638 promotes endometrial carcinoma progression by targeting MEF2C. *Int J Mol Med*. 2020;45(6):1753-70.
12. Shen Y, Chen H, Gao L, Zhang W, He J, Yang X, et al. MiR-638 acts as a tumor suppressor gene in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8(64):108170-80.
13. Pan X, He T, Peng X, Li H, Zhang F, Lai Y. miR-638 acts as an oncogene and predicts poor prognosis in renal cell carcinoma. *Am J Transl Res*. 2020;12(7):3645-59.
14. Lin Y, Li D, Liang Q, Liu S, Zuo X, Li L, et al. miR-638 regulates differentiation and proliferation in leukemic cells by targeting cyclin-dependent kinase 2. *J Biol Chem*. 2015;290(3):1818-28.
15. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 2020;103(3):38-40.
16. Berg S, Nand S. Neurological Complications of the Leukemias Across the Ages. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(2):13.
17. Leukemia. *Globocan* 2020.
18. Scarfo L, Ferreri AJ, Ghia P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;104:169-82.
19. Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;97:263-74.
20. Shago M. Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Methods Mol Biol*. 2017;1541:257-78.

21. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.
22. Lyengar V SA. *Leukemia*: StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2020
23. Skayneh H, Jishi B, Hleihel R, Hamieh M, Darwiche N, Bazarbachi A, et al. A Critical Review of Animal Models Used in Acute Myeloid Leukemia Pathophysiology. *Genes (Basel)*. 2019;10(8).
24. 06.03.2021 [Available from: https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=96&data_type=4&graph_type=5&compareBy=sex&chk_sex_1=1&series=age_range&chk_age_range_9=9&chk_age_range_141=141&chk_age_range_157=157&race=1&hdn_stage=101&advopt_precision=1#tableWrap.
25. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):620-5.
26. Canaani J, Beohou E, Labopin M, Socie G, Huynh A, Volin L, et al. Impact of FAB classification on predicting outcome in acute myeloid leukemia, not otherwise specified, patients undergoing allogeneic stem cell transplantation in CR1: An analysis of 1690 patients from the acute leukemia working party of EBMT. *Am J Hematol*. 2017;92(4):344-50.
27. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
28. 07.03.2021 [Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/2006750-overview>.
29. Schiffer CA, Stone RM. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13452/>.
30. 09.03.2021 [Available from: <https://www.konsultasyon.net/olgunlasma-goster-meyen-akut-miyeloid-losemi-aml-m1/>.
31. Sanz MA, Fenaux P, Tallman MS, Estey EH, Lowenberg B, Naoe T, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2019;133(15):1630-43.
32. Ozpolat B. Acute promyelocytic leukemia and differentiation therapy: molecular mechanisms of differentiation, retinoic acid resistance and novel treatments. *Turk J Haematol*. 2009;26(2):47-61.
33. McClellan JS, Kohrt HE, Coutre S, Gotlib JR, Majeti R, Alizadeh AA, et al. Treatment advances have not improved the early death rate in acute promyelocytic leukemia. *Haematologica*. 2012;97(1):133-6.
34. Akut Miyeloid Lösemi Türk Hematoloji Derneği 09.03.2021 [Available from: https://www.thd.org.tr/THD_Halk/?sayfa=akut_miyeloid.
35. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2002;52(1):23-47.
36. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-107.
37. Survival Rates and Outlook for Acute Myeloid Leukemia (AML) [cited 10.02.2021. Available from: <https://www.healthline.com/health/acute-myeloid-leukemia-survival-rates-outlook#age>.

38. Leukemia - Acute Myeloid - AML: Statistics [cited 10.02.2021. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/statistics#:~:text=The%205-year%20survival%20rate%20for%20people%20%20and%20older,see%20Subtypes%20for%20more%20information>.
39. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 2019;36:70-87.
40. What Causes Acute Myeloid Leukemia (AML)? 2018 [Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/causes-risks-prevention/what-causes.html>.
41. Acute myelogenous leukemia 07.03.2021 [Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/acute-myelogenous-leukemia/symptoms-causes/syc-20369109>.
42. Causes-Acute myeloid leukaemia 07.03.2021 [Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/acute-myeloid-leukaemia/causes/>.
43. Acute Myeloid Leukemia (AML)
Recent Trends in SEER Age-Adjusted Incidence Rates, 2000-2017 2017 [Available from: https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=96&data_type=1&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&race=1&age_range=1&hdn_stage=101&hdn_rate_type=1&advopt_precision=1&advopt_display=2#graphArea.
44. Akut Miyeloid Lösemi (AML) 06.03.2021 [Available from: <https://www.losemilenfomamiyelom.org/TR,23/akut-miyeloid-losemi-aml.html>.
45. Sema ANAK, Ezgi UYSALOL. Akut Miyeloid Lösemi (AML). *Çocuk Dergisi.* 2012.
46. Akut Miyeloid Lösemi Türk Hematoloji Derneği 10.02.2021 [Available from: http://www.thd.org.tr/thd_halk/?sayfa=akut_miyeloid.
47. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-74.
48. Leukemia - Acute Myeloid - AML: Diagnosis ASCO's publications 2017 [cited 10.02.2021. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/diagnosis>.
49. NCI's Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute. Prognosis.
50. [cited 10.02.2021. Available from: <https://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/leukemia-acute-myelogenous-aml/prognosis-and-survival/?region=on>.
51. Hu N, Pang Y, Zhao H, Si C, Ding H, Chen L, et al. High expression of DOCK2 indicates good prognosis in acute myeloid leukemia. *J Cancer.* 2019;10(24):6088-94.
52. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia.* 2017;31(4):798-807.
53. Stavropoulou V, Kaspar S, Brault L, Sanders MA, Juge S, Morettini S, et al. MLL-AF9 Expression in Hematopoietic Stem Cells Drives a Highly Invasive AML Expressing EMT-Related Genes Linked to Poor Outcome. *Cancer Cell.* 2016;30(1):43-58.
54. Mrozek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations, gene mutations and expression changes, and prognosis in adult acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006:169-77.

55. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
56. Cortes JE, Kantarjian H, O'Brien S, Keating M, Pierce S, Freireich EJ, et al. Clinical and prognostic significance of trisomy 21 in adult patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 1995;9(1):115-7.
57. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*. 2009;37(6):649-58.
58. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3481-5.
59. 06.03.2021 [Available from: https://seer.cancer.gov/explorer/application.html?site=96&data_type=2&graph_type=3&compareBy=sex&chk_sex_1=1&race=1&advopt_precision=1&advopt_display=2.
60. 10.02.2021 [Available from: <http://www.aml.org.tr/icerik-180>.
61. 10.02.2021 [Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/acute-myeloid-leukaemia/treatment/>.
62. Leukemia - Acute Myeloid - AML: Treatment Options ASCO Publications 2017 [cited 10.02.2021. Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/leukemia-acute-myeloid-aml/treatment-options>.
63. Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia (AML) American Cancer Society [cited 10.02.2021. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/treating/chemotherapy.html>.
64. Rebecca Roberts PD. 12.07.2021. Available from: <https://www.synthego.com/blog/crispr-cancer-cell-lines#cell-lines-for-6-different-types-of-common-cancer-types>.
65. Koefler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56(3):344-50.
66. Sak K, Everaus H. Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. *Curr Genomics*. 2017;18(1):3-26.
67. Mahbub AA, Le Maitre CL, Haywood-Small SL, McDougall GJ, Cross NA, Jordan-Mahy N. Differential effects of polyphenols on proliferation and apoptosis in human myeloid and lymphoid leukemia cell lines. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(10):1601-13.
68. Wang Q, Hui H, Yang H, Li H, Gao Y, Li Z, et al. Involvement of C/EBPbeta in monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells induced by LW-218, a new synthesized flavonoid. *Neoplasma*. 2014;61(6):647-58.
69. Birnie GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br J Cancer Suppl*. 1988;9:41-5.
70. Collins SJ. The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression. *Blood*. 1987;70(5):1233-44.
71. Fleck RA, Romero-Steiner S, Nahm MH. Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(1):19-27.
72. HL-60 CCL-240™ [Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-240>.
73. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*. 1991;77(5):1080-6.
74. Creative Bioarray cat no: CSC-C0328 [

75. NB-4
ACC 207 [Available from:
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-207>.
76. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):25-30.
77. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells.* 2020;9(2).
78. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev.* 2011;91(3):827-87.
79. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics.* 2015;5(10):1122-43.
80. Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nat Rev Genet.* 2011;12(1):19-31.
81. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;425(6956):415-9.
82. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011-6.
83. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004;303(5654):95-8.
84. Diederichs S, Haber DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell.* 2007;131(6):1097-108.
85. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:199-227.
86. Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:12-23.
87. Backes C, Meese E, Keller A. Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther.* 2016;20(6):509-18.
88. McAnena P, Tanriverdi K, Curran C, Gilligan K, Freedman JE, Brown JAL, et al. Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal a from metastatic breast cancer. *BMC Cancer.* 2019;19(1):436.
89. Frixia T, Donzelli S, Blandino G. Oncogenic MicroRNAs: Key Players in Malignant Transformation. *Cancers (Basel).* 2015;7(4):2466-85.
90. Staedel C, Tran TPA, Giraud J, Darfeuille F, Di Giorgio A, Tourasse NJ, et al. Modulation of oncogenic miRNA biogenesis using functionalized polyamines. *Sci Rep.* 2018;8(1):1667.
91. Inubushi S, Kawaguchi H, Mizumoto S, Kunihiisa T, Baba M, Kitayama Y, et al. Oncogenic miRNAs Identified in Tear Exosomes From Metastatic Breast Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2020;40(6):3091-6.
92. Liu Q, Wang D, Yuan M, He BF, Li J, Mao C, et al. Capturing intracellular oncogenic microRNAs with self-assembled DNA nanostructures for microRNA-based cancer therapy. *Chemical Science.* 2018;9(38):7562-8.
93. Liao Q, Wang B, Li X, Jiang G. miRNAs in acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2017;8(2):3666-82.
94. Pandita A, Ramadas P, Poudel A, Saad N, Anand A, Basnet A, et al. Differential expression of miRNAs in acute myeloid leukemia quantified by Nextgen sequencing of whole blood samples. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213078.
95. Hammond SM. MicroRNAs as tumor suppressors. *Nat Genet.* 2007;39(5):582-3.

96. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* 2016;76(13):3666-70.
97. Çiğdem GÜNGÖRMEZ HGA, Ersin BORAZAN. Stage II Kolon Kanserinde Tümör Süpressör miRNA olan miR-143, miR-145 ve miR-192'nin Ekspresyonu. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2017.
98. Mizoguchi A, Takayama A, Arai T, Kawauchi J, Sudo H. MicroRNA-8073: Tumor suppressor and potential therapeutic treatment. *PLoS One.* 2018;13(12):e0209750.
99. Liu X, Li J, Qin F, Dai S. miR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(6):3911-6.
100. Zhang X, Zeng J, Zhou M, Li B, Zhang Y, Huang T, et al. The tumor suppressive role of miRNA-370 by targeting FoxM1 in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer.* 2012;11:56.
101. Bhayadia R, Krowiorz K, Haetscher N, Jammal R, Emmrich S, Obulkasim A, et al. Endogenous Tumor Suppressor microRNA-193b: Therapeutic and Prognostic Value in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(10):1007-16.
102. Favreau AJ, McGlaflin RE, Duarte CW, Sathyanarayana P. miR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Experimental Hematology & Oncology.* 2016;5(1):4.
103. Yao Y, Suo AL, Li ZF, Liu LY, Tian T, Ni L, et al. MicroRNA profiling of human gastric cancer. *Mol Med Rep.* 2009;2(6):963-70.
104. Wang F, Lou J-f, Cao Y, Shi X-h, Wang P, Xu J, et al. miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-small cell lung cancer patients receiving chemotherapy. *Experimental & Molecular Medicine.* 2015;47(5):e162-e.
105. Zhou J, Guo H, Yang Y, Zhang Y, Liu H. A meta-analysis on the prognosis of exosomal miRNAs in all solid tumor patients. *Medicine (Baltimore).* 2019;98(16):e15335.
106. microRNA 638 [Homo sapiens (human)] [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/693223>.
107. 22.08.2022 [Available from: https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0003653.
108. PGK1 11.02.2021 [Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PGK1&keywords=pgk1>.
109. He Y, Luo Y, Zhang D, Wang X, Zhang P, Li H, et al. PGK1-mediated cancer progression and drug resistance. *Am J Cancer Res.* 2019;9(11):2280-302.
110. Hu H, Zhu W, Qin J, Chen M, Gong L, Li L, et al. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Hepatology.* 2017;65(2):515-28.
111. Fu D, He C, Wei J, Zhang Z, Luo Y, Tan H, et al. PGK1 is a Potential Survival Biomarker and Invasion Promoter by Regulating the HIF-1alpha-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition Process in Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(5):2434-44.
112. Junyan Gao XC, Shan He, Li Gao, Hui Hou, Fang Fang, Jian Pan, Shaoyan Hu. PGK1, a promising biomarker and therapeutic target for patients with acute myeloid leukemia who are susceptible to disease relapse. *Research Square.* 2020.
113. Transcript: ENST00000373316.5 PGK1-201 [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000102144;r=X:77910739-78129295;t=ENST00000373316.
114. HOXA9 11.02.2021 [Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HOXA9&keywords=hoxa9>.

115. Collins CT, Hess JL. Deregulation of the HOXA9/MEIS1 axis in acute leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):354-61.
116. Lambert M, Alioui M, Jambon S, Depauw S, Van Seuningen I, David-Cordonnier MH. Direct and Indirect Targeting of HOXA9 Transcription Factor in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).
117. [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000078399;r=7:27162438-27175180;t=ENST00000343483.
118. PIM1 11.02.2021 [Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIM1&keywords=PIM1>.
119. Wang XX, Liu J, Tang YM, Hong L, Zeng Z, Tan GH. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation by targeting suppress PIM1 expression in human osteosarcoma. *Tumour Biol*. 2017.
120. Cheng H, Huang C, Xu X, Hu X, Gong S, Tang G, et al. PIM-1 mRNA expression is a potential prognostic biomarker in acute myeloid leukemia. *J Transl Med*. 2017;15(1):179.
121. Wu Y, Sun R, Lun Y. Pim-1, Beyond an Oncogene, in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2015;126(23):4979-.
122. Transcript: ENST00000373509.6 PIM1-201 [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000137193;r=6:37170152-37175428;t=ENST00000373509.
123. MECP2. 11.02.2021.
124. Zhang J, Zhao J, Gao N, Wang Y, Chen Y, Han J. MECP2 expression in gastric cancer and its correlation with clinical pathological parameters. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(31):e7691.
125. Neupane M, Clark AP, Landini S, Birkbak NJ, Eklund AC, Lim E, et al. MECP2 Is a Frequently Amplified Oncogene with a Novel Epigenetic Mechanism That Mimics the Role of Activated RAS in Malignancy. *Cancer Discov*. 2016;6(1):45-58.
126. Plass C, Oakes C, Blum W, Marcucci G. Epigenetics in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol*. 2008;35(4):378-87.
127. Transcript: ENST00000453960.7 MECP2-205 [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000169057;r=X:154021573-154137103;t=ENST00000453960.
128. MEF2C 11.02.2021 [Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEF2C&keywords=mef2c>.
129. Zhang H, Liu W, Wang Z, Meng L, Wang Y, Yan H, et al. MEF2C promotes gefitinib resistance in hepatic cancer cells through regulating MIG6 transcription. *Tumori*. 2018;104(3):221-31.
130. Laszlo GS, Alonzo TA, Gudgeon CJ, Harrington KH, Kentsis A, Gerbing RB, et al. High expression of myocyte enhancer factor 2C (MEF2C) is associated with adverse-risk features and poor outcome in pediatric acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Journal of Hematology & Oncology*. 2015;8(1):115.
131. Transcript: ENST00000504921.7 MEF2C-209 [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000081189;r=5:88717117-88904257;t=ENST00000504921.
132. SP1 11.02.2021 [Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SP1&keywords=sp1>.

133. Zhang Y, Chen HX, Zhou SY, Wang SX, Zheng K, Xu DD, et al. Sp1 and c-Myc modulate drug resistance of leukemia stem cells by regulating survivin expression through the ERK-MSK MAPK signaling pathway. *Mol Cancer*. 2015;14:56.
134. Transcript: ENST00000327443.9 SP1-201 [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000185591;r=12:53380176-53416446;t=ENST00000327443].
135. SPAG1 11.02.2021 [Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPAG1&keywords=spag1>].
136. Neesse A, Gangeswaran R, Luettgies J, Feakins R, Weeks ME, Lemoine NR, et al. Sperm-associated antigen 1 is expressed early in pancreatic tumorigenesis and promotes motility of cancer cells. *Oncogene*. 2007;26(11):1533-45.
137. Shamsara E, Shamsara J. Bioinformatics analysis of the genes involved in the extension of prostate cancer to adjacent lymph nodes by supervised and unsupervised machine learning methods: The role of SPAG1 and PLEKHF2. *Genomics*. 2020;112(6):3871-82.
138. Richard-Carpentier G, Marquis M, Sauvageau G, Hebert J. High Expression of SPAG1 Is Associated with a Worse Clinical Outcome in Intermediate Risk Acute Myeloid Leukemia That Can be Partially Overcome By Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):2804-.
139. Transcript: ENST00000388798.7 SPAG1-202 [Available from: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000104450;r=8:100157906-100259278;t=ENST00000388798].
140. Karatas OF, Wang J, Shao L, Ozen M, Zhang Y, Creighton CJ, et al. miR-33a is a tumor suppressor microRNA that is decreased in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(36):60243-56.
141. Song Y, Selak MA, Watson CT, Coutts C, Scherer PC, Panzer JA, et al. Mechanisms underlying metabolic and neural defects in zebrafish and human multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD). *PLoS One*. 2009;4(12):e8329.
142. Lee W, Kim J, Yun JM, Ohn T, Gong Q. MeCP2 regulates gene expression through recognition of H3K27me3. *Nat Commun*. 2020;11(1):3140.
143. Huang H, Zhao Y, Shang X, Ren H, Zhao Y, Liu X. CAIII expression in skeletal muscle is regulated by Ca(2+)-CaMKII-MEF2C signaling. *Exp Cell Res*. 2019;385(1):111672.
144. Watanabe Y, Saito M, Saito K, Matsumoto Y, Kanke Y, Onozawa H, et al. Upregulated HOXA9 expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2018;15(3):2756-62.
145. Zelko IN, Mueller MR, Folz RJ. Transcription factors sp1 and sp3 regulate expression of human extracellular superoxide dismutase in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;39(2):243-51.
146. Boaretto F, Snijders D, Salvoro C, Spalletta A, Mostacciuolo ML, Collura M, et al. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia by a Targeted Next-Generation Sequencing Panel: Molecular and Clinical Findings in Italian Patients. *J Mol Diagn*. 2016;18(6):912-22.
147. Suer I, Karatas OF, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Buge O, et al. Characterization of stem-like cells directly isolated from freshly resected laryngeal squamous cell carcinoma specimens. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(4):347-53.
148. Vakiti A, Mewawalla P, Wood SK. Acute Myeloid Leukemia (Nursing). *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.

149. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2016;1:15004.
150. Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2011;117(4):1121-9.
151. Neaga A, Bagacean C, Tempescul A, Jimbu L, Mesaros O, Blag C, et al. MicroRNAs Associated With a Good Prognosis of Acute Myeloid Leukemia and Their Effect on Macrophage Polarization. *Front Immunol.* 2020;11:582915.
152. Buhagiar A, Borg J, Ayers D. Overview of current microRNA biomarker signatures as potential diagnostic tools for leukaemic conditions. *Non-coding RNA Research.* 2020;5(1):22-6.
153. Lin QY, Wang JQ, Wu LL, Zheng WE, Chen PR. miR-638 represses the stem cell characteristics of breast cancer cells by targeting E2F2. *Breast Cancer.* 2020;27(1):147-58.
154. Wang F, Lou JF, Cao Y, Shi XH, Wang P, Xu J, et al. miR-638 is a new biomarker for outcome prediction of non-small cell lung cancer patients receiving chemotherapy. *Exp Mol Med.* 2015;47:e162.
155. Bhattacharya A, Schmitz U, Raatz Y, Schonherr M, Kotteck T, Schauer M, et al. miR-638 promotes melanoma metastasis and protects melanoma cells from apoptosis and autophagy. *Oncotarget.* 2015;6(5):2966-80.
156. Zhu DX, Zhu W, Fang C, Fan L, Zou ZJ, Wang YH, et al. miR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis.* 2012;33(7):1294-301.
157. Zhang J, Fei B, Wang Q, Song M, Yin Y, Zhang B, et al. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation, invasion and regulates cell cycle by targeting tetraspanin 1 in human colorectal carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(23):12083-96.
158. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Dysregulation of miR-638 in the progression of cancers. *Pathology - Research and Practice.* 2021;220:153351.
159. Zhao LY, Tong DD, Xue M, Ma HL, Liu SY, Yang J, et al. MeCP2, a target of miR-638, facilitates gastric cancer cell proliferation through activation of the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway by upregulating GIT1. *Oncogenesis.* 2017;6(7):e368.
160. Lin S, Lv Y, Zheng L, Mao G, Peng F. Expression and Prognosis of Sperm-Associated Antigen 1 in Human Breast Cancer. *Onco Targets Ther.* 2021;14:2689-98.
161. Hu P, Guan K, Feng Y, Ma C, Song H, Li Y, et al. miR-638 Inhibits immature Sertoli cell growth by indirectly inactivating PI3K/AKT pathway via SPAG1 gene. *Cell Cycle.* 2017;16(23):2290-300.
162. HOXA9 17.09.2022 [Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000078399-HOXA9>.
163. SP1 17.09.2022 [Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000185591-SP1>.
164. Merkel AL, Meggers E, Ocker M. PIM1 kinase as a target for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2012;21(4):425-36.
165. Guo S, Mao X, Chen J, Huang B, Jin C, Xu Z, et al. Overexpression of Pim-1 in bladder cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29:161.
166. Warnecke-Eberz U, Bollschweiler E, Drebber U, Metzger R, Baldus SE, Holscher AH, et al. Prognostic impact of protein overexpression of the proto-oncogene PIM-1 in gastric cancer. *Anticancer Res.* 2009;29(11):4451-5.

167. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*. 2001;412(6849):822-6.
168. Deng D, Wang L, Chen Y, Li B, Xue L, Shao N, et al. MicroRNA-124-3p regulates cell proliferation, invasion, apoptosis, and bioenergetics by targeting PIM1 in astrocytoma. *Cancer Sci*. 2016;107(7):899-907.
169. Thomas M, Lange-Grunweller K, Weirauch U, Gutsch D, Aigner A, Grunweller A, et al. The proto-oncogene Pim-1 is a target of miR-33a. *Oncogene*. 2012;31(7):918-28.
170. Pan XP, Wang HX, Tong DM, Li Y, Huang LH, Wang C. miRNA-370 acts as a tumor suppressor via the downregulation of PIM1 in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(6):1254-63.
171. Wu Y, Deng Y, Zhu J, Duan Y, Weng W, Wu X. Pim1 promotes cell proliferation and regulates glycolysis via interaction with MYC in ovarian cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:6647-56.
172. Irshad K, Mohapatra SK, Srivastava C, Garg H, Mishra S, Dikshit B, et al. A combined gene signature of hypoxia and notch pathway in human glioblastoma and its prognostic relevance. *PLoS One*. 2015;10(3):e0118201.
173. Ameis HM, Drenckhan A, von Loga K, Escherich G, Wenke K, Izbicki JR, et al. PGK1 as predictor of CXCR4 expression, bone marrow metastases and survival in neuroblastoma. *PLoS One*. 2013;8(12):e83701.
174. Ai J, Huang H, Lv X, Tang Z, Chen M, Chen T, et al. FLNA and PGK1 are two potential markers for progression in hepatocellular carcinoma. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(3-4):207-16.
175. Xu D, Aka JA, Wang R, Lin SX. 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 5 is negatively correlated to apoptosis inhibitor GRP78 and tumor-secreted protein PGK1, and modulates breast cancer cell viability and proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017;171:270-80.
176. Huang B, Cai W, Wang Q, Liu F, Xu M, Zhang Y. Gankyrin Drives Malignant Transformation of Gastric Cancer and Alleviates Oxidative Stress via mTORC1 Activation. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:9480316.
177. Chen J, Cao S, Situ B, Zhong J, Hu Y, Li S, et al. Metabolic reprogramming-based characterization of circulating tumor cells in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):127.
178. Ma P, Xing M, Han L, Gan S, Ma J, Wu F, et al. High PDL1 expression drives glycolysis via an Akt/mTOR/HIF1alpha axis in acute myeloid leukemia. *Oncol Rep*. 2020;43(3):999-1009.
179. Chen JY, Xu LF, Hu HL, Wen YQ, Chen D, Liu WH. MiRNA-215-5p alleviates the metastasis of prostate cancer by targeting PGK1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(2):639-46.
180. Ye T, Liang Y, Zhang D, Zhang X. MicroRNA-16-1-3p Represses Breast Tumor Growth and Metastasis by Inhibiting PGK1-Mediated Warburg Effect. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:615154.
181. Ge J, Li J, Na S, Wang P, Zhao G, Zhang X. miR-548c-5p inhibits colorectal cancer cell proliferation by targeting PGK1. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):18872-8.
182. Zhang X, Guan MX, Jiang QH, Li S, Zhang HY, Wu ZG, et al. NEAT1 knockdown suppresses endothelial cell proliferation and induces apoptosis by regulating miR638/AKT/mTOR signaling in atherosclerosis. *Oncol Rep*. 2020;44(1):115-25.



HAM VERİLER



FORMLAR

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİR-638-5P VE AKUT MYELOİD LÖSEMİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 8	% 7	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
4	www.utsakcongress.com İnternet Kaynağı	% 1
5	Liangyi Xue, Qiaoyi Yang, Liangyi Xue, Qiaoyi Yang et al. " Molecular characterization of myostatin in black seabream, ", DNA Sequence, 2009 Yayın	<% 1
6	Submitted to Harran Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	nbn-resolving.org İnternet Kaynağı	