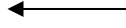
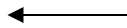


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı**
bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(Sol yandaki gibi) olacak.



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MİR-7-5P İLE AKUT MYELOİD LÖSEMİ (AML)
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

EZGİ MEHTEROĞLU

DANIŞMAN
PROF. DR. ŞÜKRÜ PALANDUZ

İKİNCİ DANIŞMAN
ÖĞR. GÖR. DR. İLKNUR SÜER

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Bu tez projesini beni bu günlere getiren ve her daim destek olan değerli aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince her daim yeni bilgiler öğrenmem ve deneyimlemem konusundaki desteğine, tez çalışmalarımı yaparken İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik Bilim Dalı bünyesindeki tüm laboratuvarları kullanabilmem konusunda yardımlarını asla esirgemeyen, akademik başarıları ve vizyonu ile daima örnek aldığım ve kendisine derin sevgi ve saygı duyduğum çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Şükrü PALANDUZ'a,

Yüksek Lisans eğitimimde çok büyük katkıları olan ve tez çalışmalarım boyunca bilgi birikimlerinden yararlandığım, verdikleri tavsiyelerle kendimi geliştirmemi sağlayan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK ve Prof. Dr. Kıvanç ÇEFLE'ye,

Tez çalışmalarım boyunca benden bilgi ve tecrübelerini asla esirgemeyen, her fırsatta güler yüzleri ile bana yalnızca hocam olarak değil aynı zamanda bir abla ve abi gibi yaklaşan, ne olursa olsun asla pes etmeyip her türlü olumsuz durumlarda bile dimdik durmayı öğreten, hayattaki bakış açıları, kişilikleri ve idealleriyle örnek aldığım, bu yolda beni cesaretlendirip daha iyi olmam için sürekli çabalayan ve yoluma ışık tutan çok sevdiğim ve saygı duyduğum sevgili hocalarım Öğr. Gör. Dr. İlknur SUER ve Dr. Murat KAYA'ya,

Tez çalışmamda kullanmış olduğum NB4 hücrelerini hediye ederek bana destek olan değerli hocam Prof. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ'ye,

Yüksek Lisansım boyunca güler yüzlerini ve desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı çalışanlarına,

Hayatım boyunca benden desteklerini ve sevgilerini asla eksik etmeyen, her daim yanımda olan, verdikleri motivasyon ile bu akademik yolda sağlam ilerlememi sağlayan ve büyük bir emekle beni bu günlere getiren sevgili aileme,

Son olarak desteğini ve sevgisini benden hiç esirgemeyen, eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yardımcı olan, verdiği motivasyon ile bu yolda en zorlandığım zamanlarda bile her daim yanımda olup beni cesaretlendiren, her zaman minnet duyduğum sevgili meslektaşım ve arkadaşım Metehan ÇELEBİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37653



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.2.1. Tarihçesi.....	9
2.2.2. Belirtileri ve Tanısı	10
2.2.3. Epidemiyolojisi ve İnsidansı.....	11
2.2.4. Sınıflandırılması.....	14
2.2.5. Tedavisi.....	17
2.3. mikroRNA (miRNA)	17
2.3.1. miRNA’ların Biyogenezi	19
2.3.2. miRNA’ların Kanserdeki Rolü	20
2.3.3. miRNA ve AML İlişkisi	22
2.3.4. miR-7-5p.....	23
2.4. Tezde miR-7-5p ile İlişkisi Araştırılacak Genler	23
2.4.1. BCL2.....	23
2.4.2. SKP2	25
2.4.3. OGT	26
2.4.4. KLF4.....	27
2.4.5. EGFR	29
2.4.6. VIM.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Gereç	32
3.1.1. HL60 ve NB4 hücre hatlarının temini.....	32
3.1.2. Gereç ve Cihazlar.....	32

3.1.2.1. Tezde Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri	32
3.1.2.2. Tezde Kullanılan Solüsyonlar	34
3.2. Yöntemler	35
3.2.1. Hücre Hatlarını Çoğaltma, Pasajlama ve Dondurma İşlemleri	35
3.2.2. Hücre Hatlarına miRNA Mimik Transfeksiyonu.....	36
3.2.3. RNA İzolasyonu.....	37
3.2.4. Transfeksiyon Validasyonu İçin cDNA sentezi ve qRT-PZR İşlemleri	38
3.2.5. Hücresel Süreçlere miR-7-5p Etkisinin Araştırılması	39
3.2.5.1. Proliferasyona Etkisi	39
3.2.5.2. Apoptoza Etkisi	40
3.2.6. miR-7-5p'nin Olası Hedef Genlerinin İn Silico Olarak Tespiti.....	41
3.2.7. Gen İfadelerinin Belirlenebilmesi İçin cDNA sentezi	42
3.2.8. Gen İfadelerinin Belirlenebilmesi İçin qRT-PZR İşlemlerinin Yapılması	43
3.2.9. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. RNA İzolasyonu.....	45
4.2. miRNA Mimik Transfeksiyonunun Validasyonu	45
4.3. Hücre Proliferasyonuna miR-7-5p Etkisi.....	46
4.4. Apoptoza miR-7-5p Etkisi	47
4.5. OGT, SKP2, BCL2, KLF4, EGFR ve VIM Genlerinin Ekspresyon Seviyelerine miR-7-5p Etkisi.....	48
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	56
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	87
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: 2022 yılına ait tahmini vaka ve ölüm sayıları (77)'den değiştirilerek alınmıştır.	14
Tablo 2: AML'nin FAB sınıflandırması (84)'den değiştirilerek alınmıştır.....	15
Tablo 3: AML'nin 2016 WHO sınıflandırması (89)'dan değiştirilerek alınmıştır.	16
Tablo 4: Tezde kullanılan cihazlar, sarf malzemeleri ve kullanım yerleri	32
Tablo 5: Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar	34
Tablo 6: Transfeksiyon ve validasyonu için gerekli solüsyonlar	34
Tablo 7: RNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar	34
Tablo 8: Transfeksiyon işleminde kullanılan bileşenler	36
Tablo 9: cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları	39
Tablo 10: qRT-PZR için gereken bileşenler ve miktarları	39
Tablo 11: Apoptoz testi için kullanılan solüsyonlar ve miktarları.....	41
Tablo 12: cDNA sentezinde miks 1 tüpünün hazırlanması için gerekli bileşenler ve miktarları.....	42
Tablo 13: Reaksiyon ürünlerinin (miks 2 tüpü) hazırlanması için gerekli bileşenler ve miktarları.....	42
Tablo 14: qRT-PZR işlemi için gereken bileşenler ve miktarları.....	43
Tablo 15: Tezde ifade seviyeleri incelenen genlere ait primer dizileri.....	44
Tablo 16: Hücrelere ait RNA konsantrasyon ve saflık değerleri.....	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: 2020'de her iki cinsiyet ve yaşta görülen kanser vaka sayıları (9)'dan değiştirilerek alınmıştır.	5
Şekil 2: Bennett tarafından çizilen lösemili bir hastanın kan hücrelerinin ilk çizimleri (30)'dan değiştirilerek alınmıştır.	6
Şekil 3: Hematopoietik farklılaşma (49)'dan değiştirilerek alınmıştır.	8
Şekil 4: AML hastalığı oluşumunda etkili faktörler (45)'den yararlanılarak hazırlanmıştır.	9
Şekil 5: Irk/Etnik köken ve cinsiyete göre 100.000 kişi başına yeni vaka oranları (77)'den değiştirilerek alınmıştır.	11
Şekil 6: Irk/Etnik köken ve cinsiyete göre 100.000 kişi başına ölüm oranları (77)'den değiştirilerek alınmıştır.	12
Şekil 7: AML'de yaş grubuna göre yeni vaka yüzdesi. Tanı konulan yeni vaka yaşı ortalama değeri 68 olarak belirlenmiş olup grafikte ait olduğu yaş aralığı kırmızı renk ile gösterilmektedir (77)'den değiştirilerek alınmıştır.	12
Şekil 8: Yaş grubuna göre ölüm oranları. Ölüm yaşı ortalama değeri 73 olarak belirlenmiş olup grafikte ait olduğu yaş aralığı kırmızı renk ile gösterilmektedir (77)'den değiştirilerek alınmıştır.	13
Şekil 9: Keşfedilen ilk miRNA'ların C. elegans'ın yaşam döngüsüne etkisi (120)'den değiştirilerek alınmıştır.	19
Şekil 10: miRNA biyogenezi (136)'dan değiştirilerek alınmıştır.	20
Şekil 11: BCL2 gen lokasyonu (199)'dan değiştirilerek alınmıştır.	24
Şekil 12: SKP2 gen lokasyonu (220)'den değiştirilerek alınmıştır.	26
Şekil 13: OGT gen lokasyonu (241)'den değiştirilerek alınmıştır.	27
Şekil 14: KLF4 gen lokasyonu (264)'den değiştirilerek alınmıştır.	28
Şekil 15: EGFR gen lokasyonu (288)'den değiştirilerek alınmıştır.	30
Şekil 16: Vimentin gen lokasyonu (299)'dan değiştirilerek alınmıştır.	31
Şekil 17: HL60 hücresi mikroskop görüntüsü (10x)	35
Şekil 18: NB4 hücresi mikroskop görüntüsü (10x)	36
Şekil 19: miRNA mimik transfekte edilmiş HL60 ve NB4 hücrelerine ait transfeksiyon validasyonu	46
Şekil 20: HL60 ve NB4 hücrelerindeki 48. ve 72. saatteki proliferasyon değişimleri ...	47

Şekil 21: NB4 hücrelerinde miR-7-5p'nin apoptoza etkisi (** $p<0,01$).....	48
Şekil 22: HL60 hücre hattında OGT, SKP2, KLF4, BCL2, EGFR ve VIM genlerinin ekspresyon düzeyleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)	49
Şekil 23: NB4 hücre hattında OGT, SKP2, KLF4, BCL2, EGFR ve VIM genlerinin ekspresyon düzeyleri (* $p<0,05$).....	49



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AGO	Argonaute
AKT	Protein Kinase B
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
BCL2	B hücreli Lenfoma 2
BH	CL2 Homoloji Motifi
CRC	Colorectal Cancer Cell
CVDK	Cell Viability Detection Kit
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
Dk	Dakika
ECD	Extracellular Domain
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FAB	French American British
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GCSC	Gastric Cancer Stem Cell
HL	Hodgkin Lenfoma
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICD	Intracellular Domain
IF	Intermediate Filament
iPSCs	Induced Pluripotent Stem Cells
KLF4	Krüppel Like Factor 4
KLL	Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDS	Myelodisplastik Sendromları
miRNA	MikroRNA
miR	MikroRNA
mL	Mililitre

mOGT	Mitochondrial O-GlcNAc Transferase
MRC	Myelodisplazi'ye bağlı değişiklikler
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
ncOGT	Nükleositoplazmik OGT
ng	Nanogram
NGF	Nerve Growth Factor
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
NOS	Not Otherwise Specified
OGT	O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
pre-miRNA	Öncül miRNA
pri-miRNA	Birincil miRNA
qPCR	Kantitatif PZR
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR
RAF	Rapid Accelerated Fibrosarcoma
RISC	RNA Induced Silencing Complex
rpm	Round Per Minute
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SCF	SKP1-cullin 1-F-box
SKP2	S-Phase Kinase Associated Protein 2
sOGT	Short OGT
TAM	Transient Anormal Myelopoez
TM	Transmembran Alanı
t-MN	Terapi ile İlişkili Myeloid Neoplazmalar
TMB	Tetramethyl-benzidine
TPR	Tetratricopeptide Repeats
TRBP	Transactivation Response Element RNA Binding Protein
UTR	Untranslated Region
VIM	Vimentin
WHO	World Health Organization
XIST	X Inactive Specific Transcript

XOP5
μL

Exportin-5
Mikrolitre



ÖZET

MEHTEROĞLU, E. (2022). MiR-7-5p ile Akut Myeloid Lösemi (AML) İlişkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz SANCAR DETAE, Genetik A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut Myeloid Lösemi (AML) blast hücrelerinin farklılaşarak aşırı çoğalması ile karakterizedir. Kanser patogeneğinde önemli rolü bilinen miRNA'lar, 18-22 nükleotid uzunluğunda kısa kodlanmayan RNA'lardır. Bu tez çalışmasında, çeşitli kanserlerde tümör supresör olarak görev aldığı bilinen miR-7-5p'nin AML'deki rolü ve olası hedef genleriyle ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla HL60 ve NB4 AML hücrelerine miR-7-5p mimiği Lipofektamin aracılı yöntemle transfekte edilmiştir. Transfeksiyon validasyonu için TaqMan primer-problar kullanılarak qRT-PZR gerçekleştirilmiştir. miR-7-5p'nin proliferasyona etkisi WST-8 yöntemi ile, apoptoza etkisi ise Kaspaz 3 miktar tayini ile incelenmiştir. miRDB, miRTarBase, Targetscan ve miRWalk veritabanları kullanılarak miR-7-5p'nin olası hedef genleri olarak belirlenen BCL2, SKP2, OGT, KLF4, EGFR genlerinin ve EMT belirteci olarak bilinen VIM geninin rölatif gen ekspresyonları karşılaştırmalı olarak qRT-PZR tekniğiyle değerlendirilmiştir. Transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği anlaşılan hücrelerde miR-7-5p transfekte edilen grupta kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunun anlamlı düzeyde azaldığı apoptoza eğilimin ise arttığı tespit edilmiştir. miR-7-5p transfekte edilen grupta kontrol grubuna kıyasla SKP2, KLF4 ve OGT genlerinin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı; BCL2, EGFR ve VIM genlerinin ekspresyon seviyelerinin ise istatistiksel olarak anlamlı seviyede değişmediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak; miR-7-5p'nin AML'de proliferasyonun azalması ve apoptozun artmasıyla ilişkisi olabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca miR-7-5p'nin AML'de kanser sürecine SKP2, KLF4 ve OGT genlerini hedefleyerek etki edebileceği düşünülmüştür. AML için erken tanı ve tedavide yeni bir belirteç olabilme potansiyeline sahip miR-7-5p'nin hedef genlerinin tespit edilmesi ve doğrulanması oldukça önem taşımaktadır. Bu yüzden mRNA düzeyinde elde edilen verilerimizin ileri çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: AML, miRNA, miR-7-5p, HL60, NB4

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37653

ABSTRACT

MEHTEROĞLU, E. (2022). Investigation of the Relationship between MiR-7-5p and Acute Myeloid Leukemia (AML). İstanbul University, Institute of Health Science, Aziz SANCAR DETAE, Genetics Department, Master Thesis. İstanbul.

Acute Myeloid Leukemia (AML) is characterized by differentiation and overgrowth of blast cells. It was aimed to investigate the role of miR-7 5p, which is known to act as a tumor suppressor, through AML and its relationship with target genes. For this purpose, miR-7-5p mimic was transfected to HL60 and NB4 AML cells by Lipofectamine-mediated method. qRT-PCR was performed for transfection validation. The effect of miR-7-5p on proliferation was investigated by WST-8 method, and its effect on apoptosis was investigated by Caspase 3 assay. The relative gene expressions of BCL2, SKP2, OGT, KLF4, EGFR genes which were determined as possible target genes of miR-7-5p using the miRDB, miRTarBase, Targetscan and miRWalk databases and VIM gene known as the EMT marker were investigated by qRT-PCR technique. In the miR-7-5p transfected group, compared to the control group, cell proliferation was found to be significantly decreased and apoptosis increased. It was determined that the expression levels of SKP2, KLF4 and OGT genes were statistically decreased in the miR-7-5p transfected group. However, it was detected that BCL2, EGFR and VIM genes expression levels did not change statistically. In addition, it was thought that miR-7-5p might affect the cancer process in AML by targeting SKP2, KLF4 and OGT genes. It is very important to detect and confirm the target genes of miR-7-5p, which has the potential to be a new marker in the early diagnosis and treatment of AML. Therefore, our data obtained at the mRNA level should be confirmed by further studies.

Key Words: AML, miRNA, miR-7-5p, HL60, NB4

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 37653

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemi, kanın üretiminden sorumlu olan kemik iliği ve lenfatik sistem dahil olmak üzere hücrelerde gerçekleşen çeşitli mutasyonlar sonucunda hücrelerin malignite kazanmasıyla meydana gelen bir kanser türüdür. Çoğunlukla anormal beyaz kan hücrelerinin hızlı üretimi sonucu gerçekleşir (1). Akut Myeloid Lösemi (AML) yetişkin popülasyonda görülen en yaygın lösemi çeşididir ve bütün vakaların yaklaşık %80'ini oluşturur (2). Kanser oluşumundaki rolü oldukça fazla olan mikroRNA (miRNA)'ların, AML oluşumunda da yüksek oranda etkisi vardır. miRNA'lar spesifik olarak hedeflenen transkriptlerin ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak baskılayan ve yaklaşık 18-22 nükleotid uzunlukta olan kodlamayan RNA'lardır. miRNA'ların çoğu kanserde olduğu gibi AML üzerinde de ifade seviyelerinin değişmesi ile kanser oluşumuna etki ettiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (3). miR-7-5p, çoğu kanser türünde tümör baskılayıcı özelliğe sahip olduğu tespit edilmiş önemli bir miRNA'dır. Yapılan çalışmalar miR-7-5p'nin kanser hücrelerinde proliferasyon, apoptoz, migrasyon ve invazyon gibi hücresel süreçler ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Yapılan bir çalışmada, miR-7-5p'nin artmış ekspresyonunun, SMO ve HES1 hedef genleri üzerinden Notch ve Hedgehog sinyal yollarını etkileyerek gastrik kanser kök hücrelerinin (GCSC'lerin) invazyonunu azalttığı bildirilmiştir. miR-7-5p'nin ifadesindeki artışın ksenograft modelinde tümör büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (4). Diğer bir çalışmada ise miR-7-5p'nin KLF4'ü hedefleyerek insan kolorektal kanser hücre (CRC) proliferasyon ve migrasyonunu inhibe edebildiği ortaya konulmuştur. Bu verilere dayanarak miR-7-5p'nin insan kolorektal kanserinin tedavisi için potansiyel bir molekül olabileceği ileri sürülmüştür (5). Bunlara ek olarak, miR-7-5p'nin PARP-1 ve BCL2 genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek servikal kanser hücrelerinin cisplatin direncini ve hücresel enerji homeostazını regüle ettiği bildirilmiştir (6). Benzer şekilde, glioblastoma dokularında ve hücre hatlarında anormal şekilde ifadesi azalan miR-7-5p'nin artmış ekspresyonunun, SATB1 geninin baskılanmasıyla glioblastoma kanser hücrelerinde hücre migrasyon ve invazyonunu etkilediği rapor edilmiştir. Sonuç olarak miR-7-5p'nin, glioblastomlu hastaların tanı ve tedavisinde yararlı bir terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir (7).

Son yapılan çalışmalarda, miR-7-5p'nin birçok kanser türünde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı ve kanser gelişimi ile tümör büyümesinin azaltılmasında oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte literatürde AML'nin miR-7-5p ile ilişkisini inceleyen tek bir çalışmanın bulunması bizi bu yönde bir araştırmaya yönlendirmiştir. Bu amaç doğrultusunda AML hücre hatları olan HL60 ve NB4 hücreleri kullanılarak miR-7-5p'ye ait mimik transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir ve miR-7-5p'nin hücresel süreçlere olan etkisinin incelenmesi amacıyla proliferasyon ve apoptoz deneyleri yapılmıştır. Ardından miRDB, miRTarBase, Targetscan, miRWalk gibi in silico programlar aracılığıyla miR-7-5p'nin olası hedef geni olarak 5 proto-onkogen tespit edilmiştir. Bu proto-onkogenlerin miR-7-5p transfeksiyonu yapılan AML hücre hatlarındaki ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak AML hücrelerinde hücre proliferasyonu ve apoptozu etkilediği tespit edilen miR-7-5p'nin SKP2, KLF4 ve OGT genlerinin ekspresyonlarını da anlamlı seviyede azalttığı belirlenmiştir. Çalışma bulgularımızla, kanser sürecinde önemli rollere sahip olan bu onkogenlerin miR-7-5p mimik transfeksiyonu sonrasında mRNA seviyesinde azaldığının belirlenmesi tanı ve tedavi açısından yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi adına önem taşımaktadır. Bununla birlikte bu genlerin miR-7-5p'nin olası hedef genleri olmaktan çıkıp AML'de miR-7-5p'nin kesin hedefi olarak nitelendirilebilmeleri için bu tez çalışması bir ön çalışma niteliğinde olması nedeniyle de değerli olduğunu düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

Kanser, DNA dizileri üzerinde gerçekleşen nokta mutasyonları, delesyonlar, duplikasyonlar, kromozomal translokasyonlar veya insersiyonlar yoluyla ya da UV ışınlarına ve radyasyona maruz kalınımı, alkol ve sigara kullanımı gibi çevresel faktörlerin de etkisiyle genetik/epigenetik düzeyde gerçekleşen değişimler sonucunda hücrelerin kontrolsüz çoğalma ve bölünme özelliği kazanması ile meydana gelen kompleks bir hastalıktır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC)'nın belirlediği verilere göre Dünya genelinde her 5 kişiden 1'i kansere yakalanmaktadır. Kanserden ölüm oranı ise erkeklerde 1/8 iken kadınlarda 1/11'dir (8). GLOBOCAN verilerine göre ise 2020 yılındaki her yaş, ırk ve cinsiyette görülen ve tüm kanser türlerinin dahil olduğu vaka sayısı 19.292.789 ve kanserden ölen vaka sayısı ise 9.958.133 olarak belirlenmiştir (9). Tüm bu verilere bakıldığında kanserin dünyada sık görüldüğü ve yüksek ölüm oranlarına sahip hastalıklardan biri olduğu anlaşılmaktadır. Kanserli hücrelerin gelişip çoğaldıkları doku ve organlardan vücudun farklı bölgelerine taşınması olayına metastaz denir. Metastaz yapan kanser türleri genellikle hızlı çoğalma ve yayılım özelliği gösterirler. Bu kanser türlerine malign (kötü huylu) tümörler denir. Metastaz eğiliminde olmayıp yalnızca bulundukları doku ve organlarda gelişen kanser türlerine iyi huylu (benign) tümörler adı verilir. Bu tümörler genellikle yavaş çoğalma özelliğine sahiptirler. Kanserler bulundukları organ veya dokulara göre isimlendirilmektedirler. Solid tümörler ve hematolojik maligniteler olmak üzere kanserin iki ana türü bulunmaktadır (10).

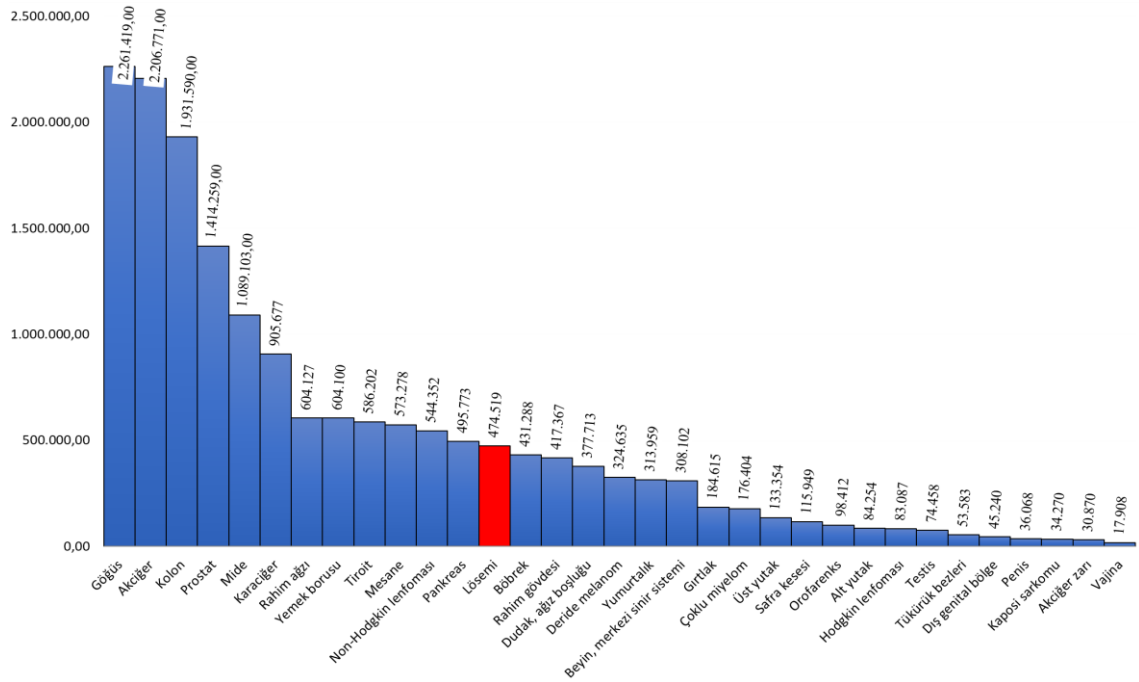
Hematolojik maligniteler (kan kanserleri) kemik iliği veya lenfatik sistemde bulunan hücrelerin farklılaşması ve kontrolsüz çoğalmasıyla gelişen kötü huylu kanser türlerindendir. Hematolojik kanserler, myelomlar, lösemiler ve lenfomalar olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadırlar (11–13). Myelomlar, kemik iliğinde bulunan plazma hücrelerinin farklılaşması sonucu kontrolünü kaybederek aşırı çoğalması ile karakterize olan bir kanser türüdür. Genellikle organ yetmezliği, iskelet lezyonları ve anemi ile birlikte ölüme kadar götürmektedir (14,15). Lösemiler, beyaz kan hücrelerinin farklılaşması sonucunda anormal beyaz kan hücrelerinin çok miktarda oluşumu ve çoğalması ile karakterize bir kanser türüdür. Lösemiler akut ve kronik lösemi olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Akut lösemiler çoğunlukla hızla ilerlemekte ve çabuk belirti vermektedirler. Kronik lösemiler ise daha yavaş ilerlemekte ve belirtileri yıllar içerisinde

ortaya çıkmaktadır (16). Lenfomalar diğer bir adıyla lenf kanserleri ise lenfositlerin farklılaşarak kanserleşmiş hücrelere dönüşüp lenf bezlerinde veya diğer dokularda birikimi ile karakterize bir kanser türüdür. Çoğunlukla biriktikleri dokularda nodül adı verilen kitle oluştururlar. Lenfomalar, Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) ve Hodgkin Lenfoma (HL) olmak üzere 2 ana gruba ayrılmaktadırlar (17–19).

2.1. LÖSEMİLER

2.1.1. Tanımı ve Sınıflandırılması

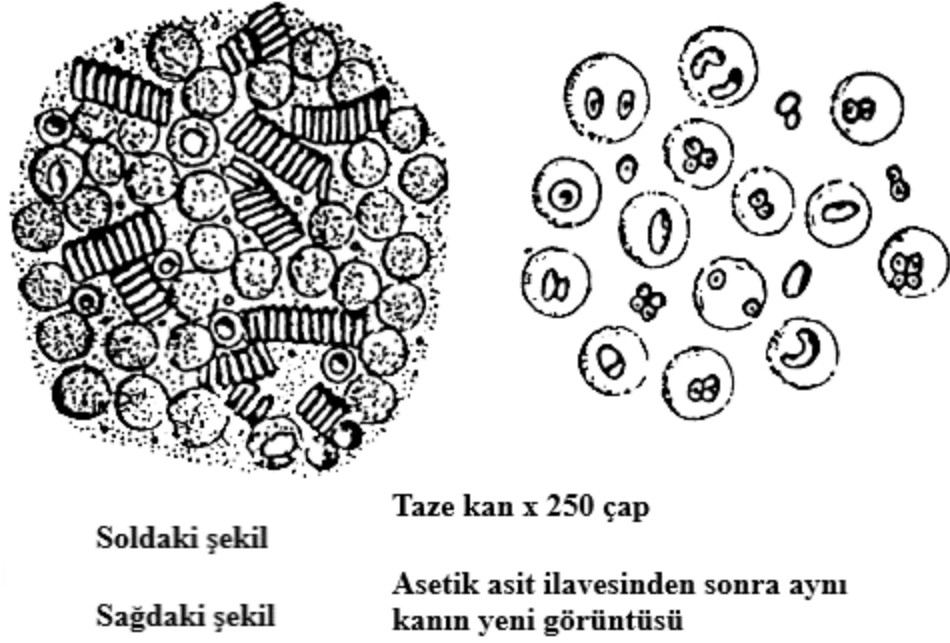
Lösemi, kemik iliği ve diğer hematopoietik organlar olan lenf bezleri, dalak vb. kan üretiminde görevli organlardaki farklılaşma sonucu beyaz kan hücrelerinin değişim geçirerek kontrolsüz bir şekilde aşırı çoğalmasından kaynaklanan bir kan kanseri türüdür (20,21). Lösemi, dünyada en çok görülen kanser türlerinden biridir. GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında her yaşta ve cinsiyette görülen kanserler listesinde lösemi 13. sırada yer alırken, lösemi teşhisi konmuş kişi sayısı ise 474519'dur (Şekil 1) (9). Temelde lösemiler, ilerleme hızlarına (akut veya kronik) ve etkilediği hücre tiplerine (myeloid veya lenfoid) göre gruplara ayrılırlar. Bunlar, Akut Myeloid Lösemi (AML), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Kronik Lenfoblastik Lösemi (KLL)'dir (22). Akut lösemiler, olgunlaşmamış kan hücreleri olan myeloid veya lenfoid hücrelerin sınırsız bir bölünme yeteneği kazanıp hızla çoğalmasıyla ortaya çıkan bir lösemi türüdür (23–25). Genellikle ani başlangıç göstermektedir ve çocukluk çağında görülen tüm lösemi türlerine oranla en yaygın olanıdır (26,27). AML ve ALL bu grupta yer almaktadır. Kronik lösemiler ise akut lösemilerin aksine daha yavaş ilerleme gösterir ve yetişkinlerde görülme oranı çok daha yüksektir. Kronik lösemide anormal kan hücreleri olgunlaşır ancak zamanla birikerek lösemnin ilerlemesine sebep olurlar (23). Bu nedenle hastalık belirtileri genellikle uzun sürede gelişirken tanı aşamasında hastalar asemptomatik olabilirler (24,28). KML ve KLL ise bu grupta yer alırlar.



Şekil 1: 2020'de her iki cinsiyet ve yaşta görülen kanser vaka sayıları (9)'dan değiştirilerek alınmıştır.

2.1.2. Tarihçesi

Löseminin literatürde bilinen kesin bir tarihçesi tam anlamıyla belirtilmese de erken tarihinin 200 yıl öncesine kadar dayandığı bildirilmektedir. John Bennett ve Rudolf Virchow lösemi teşhisi konulmasında ve bu terimin kullanılmasında öncülük eden iki önemli bilim insanıdır. Bennett, kanda gözlemlediklerinin o zamanlar bilinen iltihaplanma vakalarından tamamen farklı olduğunu, kanda gerçekleşen değişimin iltihaptan bağımsız olduğunu ve bu değişikliklerin tüm sistemde gerçekleştiği sonucuna varmıştır. Tüm kan kütlesi etkilenmekle beraber mikroskopik incelemeler sonucunda da çeşitli boyutlarda yuvarlak tanecikler görülmüştür. Bu yuvarlak taneciklerin çekirdeklerine bakıldığında ise normalde bir büyük granül görülmesi gerekirken iki veya üç küçük granülden oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin çizimlerini yayınlamıştır ve bu çizimler lösemi hastalığının göstergesi olan kan örneklerinin ilk çizimleri olmuştur (Şekil 2) (29,30).



Şekil 2: Bennett tarafından çizilen lösemili bir hastanın kan hücrelerinin ilk çizimleri (30)'dan değiştirilerek alınmıştır.

İkinci gözlem ise Virchow tarafından rapor edilmiştir. 1845 yılında 4 yıllık hastalık öyküsü olduğu bilinen ve karnında oluşan şişlik ile hastaneye başvuran hastasının ölümü sonucunda otopsisini incelediğinde hastanın damarlarının her yerinde, tamamiyle irine benzeyen bir kitle olduğunu ve aynı zamanda kanın mikroskopik incelemelerinde ise çeşitli şekillerde hücre çekirdeklerine rastlandığı bildirilmiştir. Bennett tarafından daha önce de bahsedildiği gibi, renksiz hücrelerin farklı boyut ve şekillerde olduğunu açıklamak için bilinen beyaz kan tanımını değiştirmiştir (31). Virchow, 1847 de yine önceki vakaya benzer bir vaka bildirmiştir ve ilk kez bu yeni gözlenen hastalığın adlandırılmasını lösemi (beyaz kan) olarak belirlemiştir (32). Beyaz kan aslında literatürde belirtilen ilk tanımlama değildir. Dr. Beal 1729'da ve Dr. Lower 1749'da beyaz kan tanımını kullanmıştır (33).

Lösemi hastalığı ilk olarak bulguları 1855'e kadar yayınlanmamış olan Donne tarafından gözlemlenmiş olsa da Bennett'in makalesi, lösemiye klinik açıdan tanınırlık sağlamıştır (34). Alfred Frangois Donne, ilk kez löseminin anormal hücrelerle ilişkili olduğunu bulmuştur. Henry William Fuller ise Bennett ve Virchow tarafından rapor edilmiş olan kan hücrelerinde gerçekleşen değişikliklerin mikroskop ile gösterimini ve globüllerin anormal yapısını tanımlamıştır. Bununla birlikte, lösemiye histolojik testler

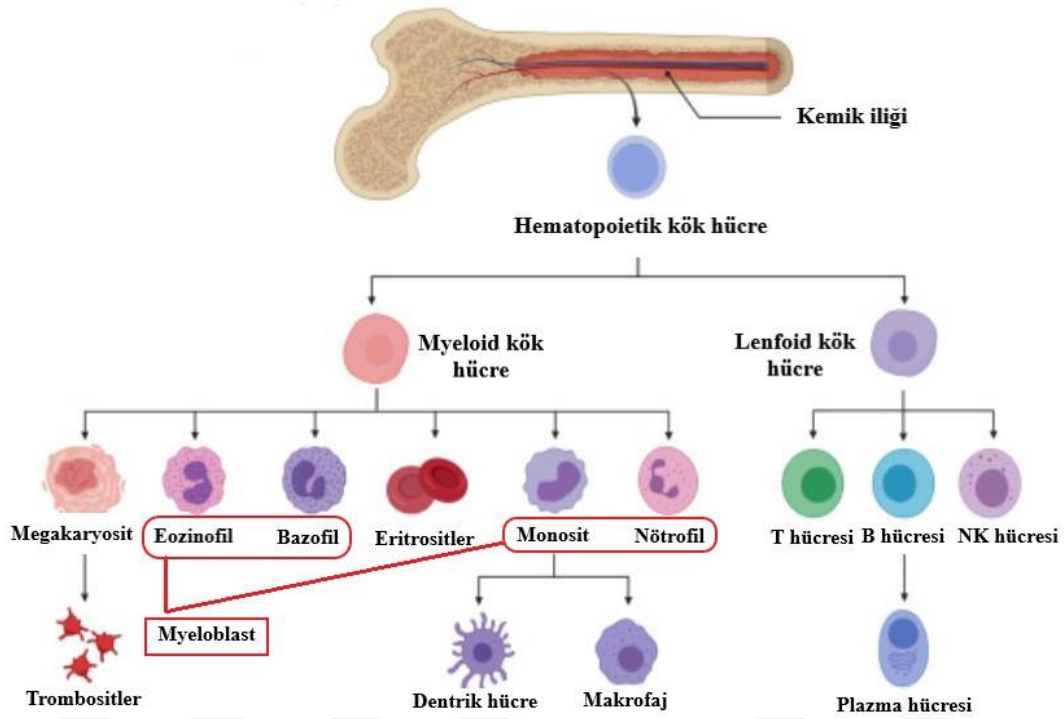
kullanarak tanımlamıştır ve lösemiye ait tüm semptomları birleştirmiştir. 1846'da ilk kez mikroskop ile incelenmiş lösemi tanısına hasta hayattayken ulaşmıştır. Tüm bunlara ek olarak ilk kez çocukluk çağı lösemi vakasını bildirmiştir. Bu durumun önemli olmasının sebebi ise bu zamana kadar çocukların sadece enfeksiyon taşıyıcısı olarak düşünülmesidir. Bu sebeple lösemi tanısındaki çocuklar hastanelerden bağımsız özel olarak başka yerlere kapatılmışlardır (32,35).

1847'de Virchow, dalak ve lenfatik olmak üzere iki tür lösemi tanımlamıştır (32,36). Ernst Christian Neumann 1868'de kemik iliğinde gerçekleşen değişiklikleri ve kemik iliği ile lösemi hastalığı arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır (33,37). 1877'de Paul Ehrlich, ilk kez lösemnin en temel sonuçlarını bildirmiştir ve aynı zamanda çekirdek, sitoplazma ve kan hücrelerinin net bir tanımını yapmıştır. Tüm bunlara ek olarak Ehrlich, lösemnin hemapoyetik sisteme ait bir hastalık olduğu görüşünü öne sürmüştür (38). 1927'de Mikhail Arinkin, kemik iliği aspirasyonunu tanımlamıştır ve 1933'te R. P. Custer, lösemide yeni bir teşhis yöntemi olarak kemik iliği biyopsisini tanıtmıştır (33). Modern lösemi tedavisi 1948'de Sidney Farber tarafından geliştirilen folik asit kullanımının anti kanser tedavisi olarak kullanılabileceğinin tanıtılmasıyla başlamıştır (39,40). Farber'in yayınından sonra ise yeni anti-lösemik ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bunlar içerisinde en bilinen ilaçlar 1953'te Burchenal ve Lois Murphy tarafından geliştirilen ve çocuk lösemisinde pozitif bir etkisi olduğu öne sürülen pürin antagonisti 6-merkaptopürindir. Daha sonra ise 1961'de L-asparaginaz, 1962' de ise Vinkristin gibi anti-lösemik etkisi olan diğeri ilaçlar piyasaya sürülmüştür (41). Günümüze kadar pek çok anti-lösemik etkisi olan ilaç üretilmiştir. Kemoterapi yanı sıra kombine terapi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve kök hücre nakli gibi lösemi hastalığının tedavisine yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

2.2. AKUT MYELOİD LÖSEMİ (AML)

AML, hematopoyetik kök hücrelerde rastgele gerçekleşen genetik farklılaşmalar sonucunda etkilenen anormal blast hücrelerinin sınırsız aşırı çoğalması ve birikimi ile karakterize heterojen malign bir hastalıktır (Şekil 3) (42–46). Anormal blast hücreleri kemik iliğinde sayıca oldukça fazla düzeyde birikebilir ve ardından periferik kana geçebilir. Periferik kanda da sayıca biriken anormal blast hücreleri, kan aracılığıyla başta

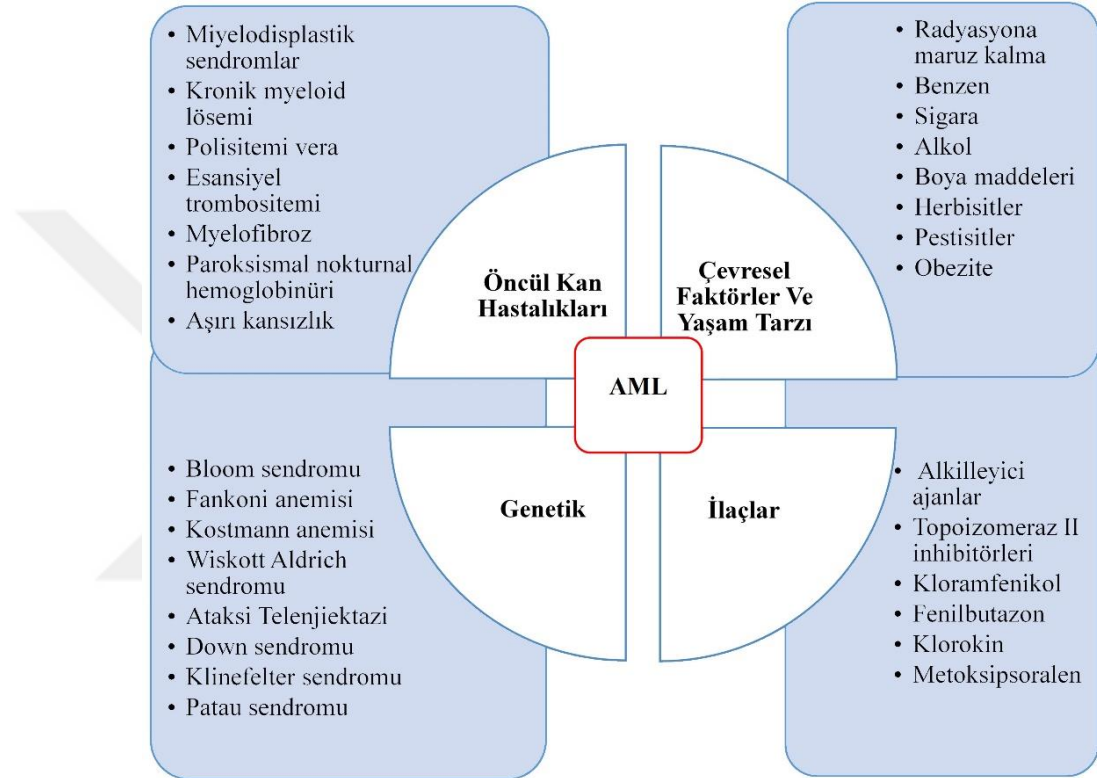
karaciğer olmak üzere merkezi sinir sistemi, dalak, lenf düğümleri ve testis gibi organlara da sızarak organların işlevlerini bozabilir (42,47,48).



Şekil 3: Hematopoietik farklılaşma (49)'dan değiştirilerek alınmıştır.

AML heterojen bir hastalıktır ve hastalığın gelişiminde rol oynayan birçok faktör vardır. Bunlar arasında öncül kan hastalıkları, çevresel faktörler ve yaşam tarzı, ilaçlar ve genetik gibi çeşitli faktörler AML gelişimine zemin hazırlamaktadır (Şekil 4) (45,50,51). Özellikle genetik faktörler AML üzerinde doğrudan rol oynamaktadır. AML tanısında hastalık ile doğrudan ilişkili olarak bilinen sitogenetik değişiklikler vardır. Bunlar; $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$, $t(9;11)(p22;q23)$ ve $t(15;17)(q22;q12)$ 'dir (47,52–55). Gerçekleşen tüm bu kromozomal yeniden düzenlenmeler, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan füzyon proteinlerinin oluşumuna sebep olabilmektedirler. Füzyon proteinlerinin oluşumu ise artmış tirozin kinaz aktivitesi sebebiyle hücrelerin sınırsız çoğalma özelliği kazanması ile sonuçlanmaktadır. Bu oluşumlar AML'nin tanımlanmasında oldukça önem kazanmaktadır. AML gelişiminde sitogenetik değişikliklerin yanı sıra çeşitli moleküler seviyede genetik değişikliklerin de rol oynadığı bilinmektedir. Hastalık ile ilişkili en

yaygın görülen mutasyonlar FLT3, KRAS, NRAS, JAK2, CEBPA, NPM1, IDH1 ve IDH2, ASXL, DNMT3A ve TET2 mutasyonlarıdır. Bazı durumlarda hem sitogenetik boyutta hem de moleküler genetik boyutta etkilene söz konusuyken, bazı vakaların sitogenetik açıdan normal olmasına karşın AML ile ilişkili genlerin mutasyona uğramış olduğu görülmektedir (42,56–60).



Şekil 4: AML hastalığı oluşumunda etkili faktörler (45)’den yararlanılarak hazırlanmıştır.

2.2.1. Tarihçesi

Lösemnin klinik olarak resmen tanımlanmasının ardından hastalıkla ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. 1872’de Franz Ernst C. Neumann, kemik parçalarını inceleyerek lösemnin aslında kemik iliğinde başladığını ve kök hücre adını verdiği bir öncüden kaynaklandığını varsaymıştır. Aynı zamanda Neumann, kemik iliğinden kaynaklandığını düşündüğü ve myeloid lösemi olarak adlandırdığı lösemnin bir başka türü daha olduğunu öne sürmüştür (33,61–63). 1877’de tıp öğrencisi olan Paul Ehrlich, histokimyasal boyama tekniği geliştirerek ilk kez kan hücrelerindeki farklı tip

çekirdekleri ve kandaki sitoplazmik bileşenleri incelemiştir (35,64,65). 1900’de Otto Naegeli ilk kez myeloblast ve lenfoblast ayrımını yapmıştır. 1913’te lösemi ilk kez sınıflara ayrılmış ve bunlara AML, ALL, KML ve KLL isimleri verilmiştir (33,63). Theodor Boveri 1914’te kanserin kromozomal değişikliklerin sonucunda gelişebileceğini ve genetik olarak kararsız tek bir hücrenin varlığının bile kanser gelişiminde rol oynayabileceğini öne sürmüştür (62,66,67). Nowell ve Hungerford 1960 yılında metafaz kromozomlarının incelenmesi sayesinde sitogenetik düzeyde Philadelphia kromozomunu keşfetmişlerdir (68). Gelişen kromozom bantlama teknikleri aracılığıyla kromozomlar daha detaylı incelenmiştir ve lösemnin gelişiminde rol oynayan anormallikler zamanla detaylandırılmıştır. Ve son olarak 2003’te tamamlanan İnsan Genom Projesi ile insan genomunun bütün genleri incelenerek sitogenetik anormalliklere sebep olan genlerin ve bu genlerle bağlantılı diğer genlerin tanımlanmasına katkı sağlanmıştır ve bu sayede içinde AML’nin de bulunduğu çeşitli kanser türlerinin tanı, prognoz ve tedavilerinin geliştirilmesinde önemli yol alınmıştır (62,67,69).

2.2.2. Belirtileri ve Tanısı

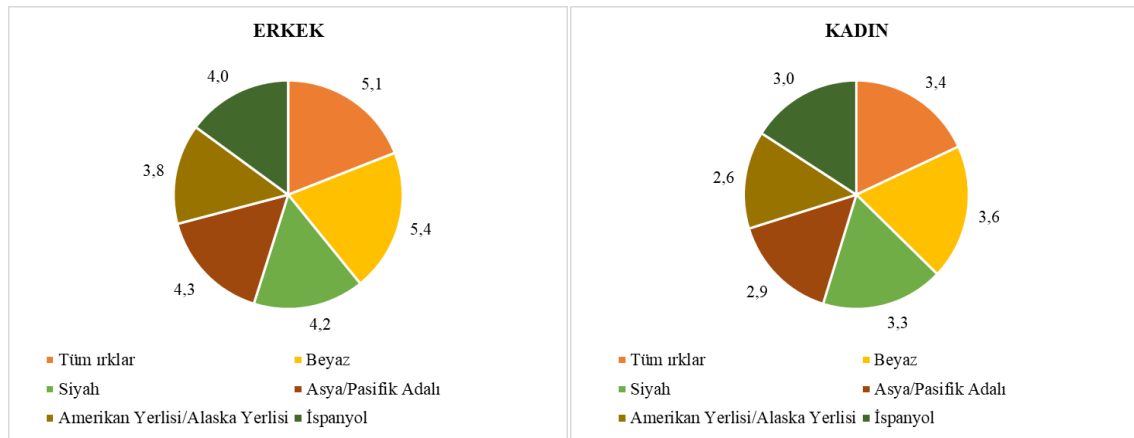
AML hastalığı çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmakta ve gelişmeye devam etmektedir. Hastalık ilerledikçe bazı belirtiler ortaya çıkmaktadır. Anormal blast hücrelerinin kemik iliğinde aşırı birikimi sebebiyle kan hücreleri etkilenmekte ve anemi, trombositopeni, nötropeni gibi durumlar oluşmaktadır (70). Trombositopeni sonucunda diş eti ve burun kanamaları gibi çeşitli kanamalar, kol ve bacaklarda morluklar meydana gelmektedir. Sayıca çoğalan lösemik hücreler dokulara ve organlara sızabilir. Dokulara sızan anormal lösemik hücreler splenomegali, hepatomegali ve deri sızıntılarına sebep olmaktadır (71). Kemik iliğinin yetersizliği sebebiyle kemik ağrıları görülmektedir ve anemi gelişimi sebebiyle de halsizlik, aşırı yorgunluk, uyuşukluk, ateş ve nefes darlığı kemik ağrılarına eşlik eden diğer belirtilerdendir. Aynı zamanda hastalarda iştah kaybı ve bunun sonucunda da kilo kaybı görülmektedir (65).

Periferik kan ve kemik iliği yayma teknikleri ile lösemik hücreler incelenerek AML tanısı koyulabilmektedir. Bu yöntemde kemik iliğinde ve kanda bulunan blast hücrelerinin varlığına bakılmaktadır. Bunun yanı sıra kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi ile lösemik hücrelerin sayılarına ve AML hücre tipine bakılarak da teşhis

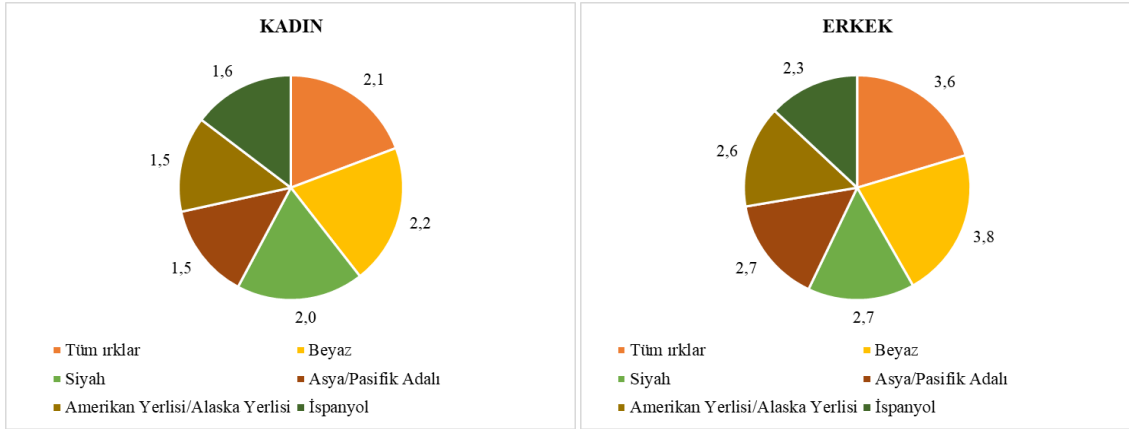
edilebilmektedir. Bunlara ek olarak sitogenetik analizlerle de AML hastalığının teşhisini koymak mümkündür (67). Aynı şekilde AML tipini belirlemek için de immünofenotipleme yapılmaktadır. Böylece AML tipi netleştirilerek buna göre doğru tedavinin tespiti sağlanmaktadır (72).

2.2.3. Epidemiyolojisi ve İnsidansı

AML, tüm kanser türleri ile karşılaştırıldığında yalnızca kanserlerin %1'lik kısmını oluştursa da özellikle diğer lösemi türlerine oranla yetişkinlerde en sık görülen lösemi türüdür (48,73–75). Yetişkinlerde görülme sıklığı 13-15/100000 iken daha genç yaşlardaki görülme sıklığı 2-3/100000'dir (76). AML'nin görülme oranının yaşlı yetişkinlerde ve erkeklerde kadınlara göre çok daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Şekil 5) (77–80). 2022 yılı SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) verilerine göre 2014-2018 yılları arasında yapılan araştırmalarla tüm ırk, etnik köken ve cinsiyete göre ayrılan gruplarda erkeklerdeki vaka sayılarının ve ölüm oranlarının kadınlara göre çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (Şekil 5-6) (77). AML'nin en sık görüldüğü yaş aralığı 65-74 yaş olarak bildirilirken, AML kaynaklı ölüm oranının en yüksek olarak bildirildiği yaş 75-84'tür (Şekil 7-8).

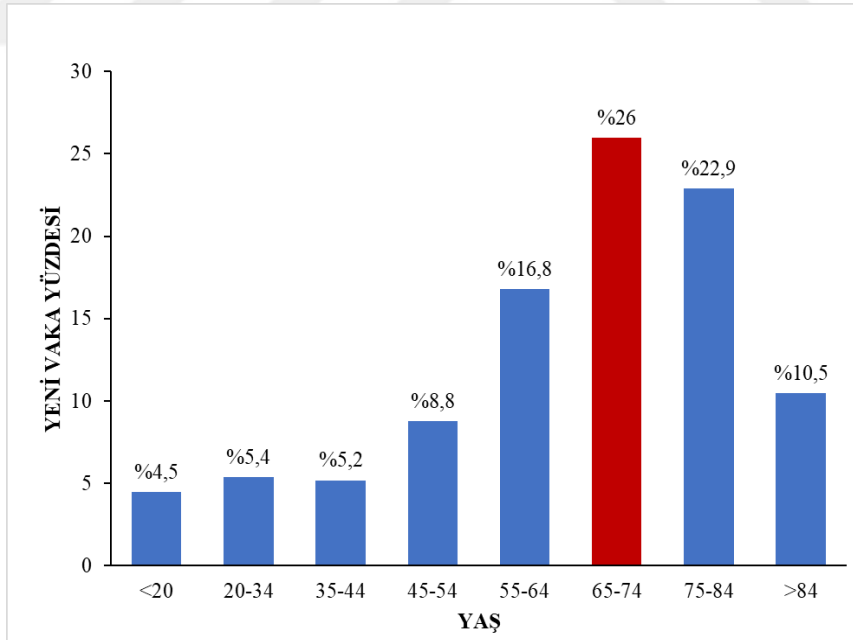


Şekil 5: İrk/Etnik köken ve cinsiyete göre 100.000 kişi başına yeni vaka oranları (77)'den değiştirilerek alınmıştır.

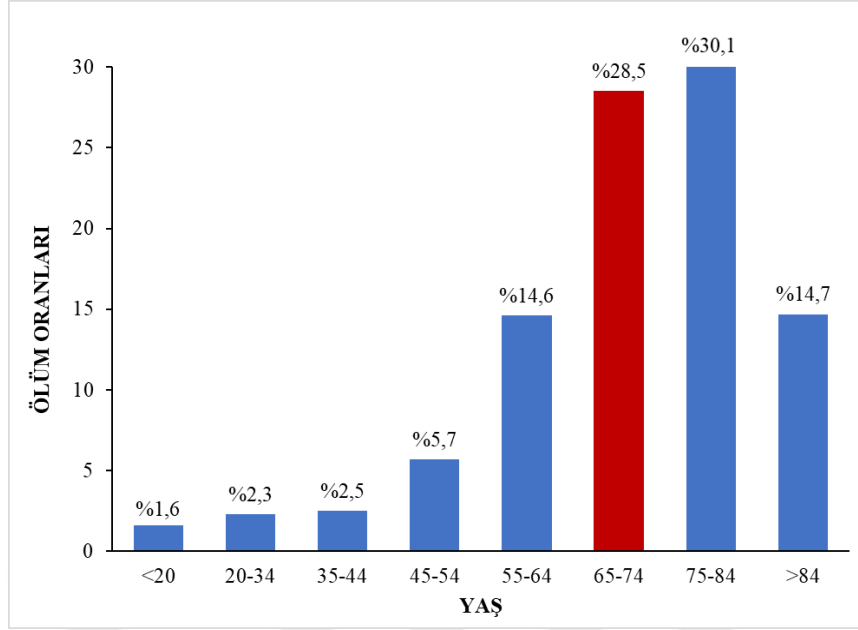


Şekil 6: İrk/Etnik köken ve cinsiyete göre 100.000 kişi başına ölüm oranları (77)'den değiştirilerek alınmıştır.

Tüm bunlara ek olarak 2022 yılı SEER verilerine göre, yeni vaka sayılarındaki tanı yaşının ortalama değeri 68 olarak belirtilirken, ölüm yaşının ortalama değeri ise 73 olarak belirtilmiştir (Şekil 7-8) (77).



Şekil 7: AML'de yaş grubuna göre yeni vaka yüzdesi. Tanı konulan yeni vaka yaşı ortalama değeri 68 olarak belirlenmiş olup grafikte ait olduğu yaş aralığı kırmızı renk ile gösterilmektedir (77)'den değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 8: Yaş grubuna göre ölüm oranları. Ölüm yaşı ortalama değeri 73 olarak belirlenmiş olup grafikte ait olduğu yaş aralığı kırmızı renk ile gösterilmektedir (77)'den değiştirilerek alınmıştır.

SEER kanser verilerine göre 2022 yılında tahmini olarak yeni AML vaka sayısının 20.050 ve tahmini ölüm sayısının ise 11.540 olacağı düşünülmektedir (Tablo 1) (77).

Tablo 1: 2022 yılına ait tahmini vaka ve ölüm sayıları (77)'den değiştirilerek alınmıştır.

Yaygın Kanser Türleri	Tahmini Yeni vaka sayıları	Tahmini Ölüm Sayıları
Meme Kanseri	287.850	43.250
Prostat Kanseri	268.490	34.500
Akciğer ve Bronş Kanseri	236.740	130.180
Kolorektal Kanser	151.030	52.580
Cilt Melanomu	99.780	7.650
Mesane Kanseri	81.180	17.100
Non-Hodgkin Lenfoması	80.470	20.250
Böbrek ve Böbrek Pelvis Kanseri	79.000	13.920
Rahim Kanseri	65.950	12.550
Pankreas Kanseri	62.210	49.830
Lösemi	60.650	24.000
▪ Akut Myeloid Lösemi	20.050	11.540

2.2.4. Sınıflandırılması

Löseminin myeloid ve lenfoid olarak ayrılmasından sonra gelişen teknikler sayesinde lösemi patogenezinde rolü olan birçok değişikliğin keşfedilmesiyle hastalığın alt gruplarının oluşması mümkün olmuştur ancak bu durum bir dizi karmaşıklıkla da beraberinde getirmiştir. Bu karmaşanın giderilmesi için birçok sınıflandırma çeşidi sunulmuştur ancak bu sınıflandırmaların büyük çoğunluğu her hastaya uymadığından reddedilmiştir. Daha önceleri kemik iliği ve periferik kan yaymaları kullanılarak patolojik incelemeler ile hastalığın teşhisi konulmaktaydı. Ancak moleküler düzeyde birtakım heterojen farklılıkların olması ve hücrelerin morfolojik olarak farklılık göstermesi bir sınıflandırma sistemi oluşturulmasına temel sağlamıştır (81). 1976'da 7 hematoloğun bir araya gelerek oluşturduğu sınıflandırma türü olan French American British (FAB) sınıflandırma sistemi bu karışıklığın giderilmesini sağlamış ve her hastada kullanılabilecek güvenilir bir sınıflandırma olmuştur (81–83). Bu sınıflandırma sistemi myeloid ve lenfoid lösemi olarak iki gruba ayrılmakta ve her bir lösemi türü için

hastalığın prognozuna dair açıklamalar içermektedir. AML için oluşturulmuş FAB sınıflandırması 8 alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar Tablo 2’de gösterilmektedir (65,83,84).

Tablo 2: AML’nin FAB sınıflandırması (84)’den değiştirilerek alınmıştır.

FAB Sınıflandırması	
M0	Farklılaşma göstermeyen Akut Myeloblastik Lösemi
M1	Olgunlaşmamış veya minimal farklılaşma gösteren Akut Myeloblastik Lösemi
M2	Olgunlaşmış veya farklılaşmış Akut Myeloblastik Lösemi
M3	Promyelositik Lösemi
M4	Akut Myelomonositik Lösemi
M5	Akut Monositik Lösemi
M6	Akut Eritroid Lösemi
M7	Akut Megakaryositik Lösemi

1964’te yayınlanan FAB sınıflandırmasının yaygın olarak kullanılmasının ardından 2001 yılında yeni bir sınıflandırma sistemi olan World Health Organization (WHO) sınıflandırma sistemi ortaya çıkmıştır. WHO sınıflandırma sistemi, FAB sınıflandırma sistemini kaynak almakla birlikte birtakım eklemeler yapılarak yayınlanmıştır. Bu eklemeler AML’nin tekrarlayan genetik değişiklikleri, çok soylu displazileri ve tedaviyle ilişkili AML ve Myelodisplastik Sendromları (MDS) içermektedir (85–87). 2008 yılında WHO sınıflandırması AML’nin genetik, klinik ve morfolojik açısından değişimlerinin de eklenmesiyle yeni bir versiyon olarak güncellenmiştir (65,88). AML’nin her açıdan detaylı olarak sınıflandırılmasının ardından yapılan çalışmalarla birlikte tekrarlayan mutasyonların ve yeni varyasyonlarında keşfinden sonra 2016 yılında WHO sınıflandırması yeniden revize edilmiştir. 2016 WHO sınıflandırması AML’nin 6 ayrı kategoride incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bunlar AML ile ilgili neoplazmalar, myelodisplazi’ye bağlı değişiklikler (MRC), Terapi ile ilişkili Myeloid Neoplazmalar (t-MN), aksi belirtilmemiş (NOS), myeloid sarkoma ve Down sendromu ile ilişkili myeloid proliferasyonlardır (Tablo 3) (53,87,89).

Tablo 3: AML'nin 2016 WHO sınıflandırması (89)'dan değiştirilerek alınmıştır.

2016 WHO Sınıflandırması
Akut Myeloid Lösemi (AML) ve ilgili neoplazmalar
▪ Tekrarlayan genetik anormallikleri olan AML - t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 - inv(16)(p13.1;q22) veya t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 - PML-RARA ile APL - t(9;11)(p21.3;q23.3); KMT2A-MLLT3 - t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 - inv(3)(q21.3;q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM - t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1 - t(1;22)(p13.3;q13.1); RBM15-MKL1 (Megakaryoblastik) - Geçici varlık: BCR-ABL1 - Mutasyona uğramış NPM1 - CEBPA biallelik mutasyonlu AML - Geçici varlık: mutasyona uğramış RUNX1 ▪ Myelodisplazi ile ilgili değişikliklerle birlikte AML ▪ Tedaviye bağlı Myeloid neoplazmalar ▪ AML, aksi belirtilmemiş (NOS) - Minimum farklılaşmış AML - Olgunlaşmamış AML - Olgunlaşmış AML - Akut Myelomonositik Lösemi - Akut Monoblastik ve Monositik Lösemi - Saf Eritroid Lösemi - Akut Megakaryoblastik Lösemi - Akut Bazofilik Lösemi - Myelofibrozu Akut Panmiyeloz ▪ Myeloid Sarkom ▪ Down sendromu ile ilişkili myeloid proliferasyonlar - Down sendromu ile ilişkili geçici anormal Myelopoez (TAM) - Down sendromu ile ilişkili Myeloid Lösemi

2.2.5. Tedavisi

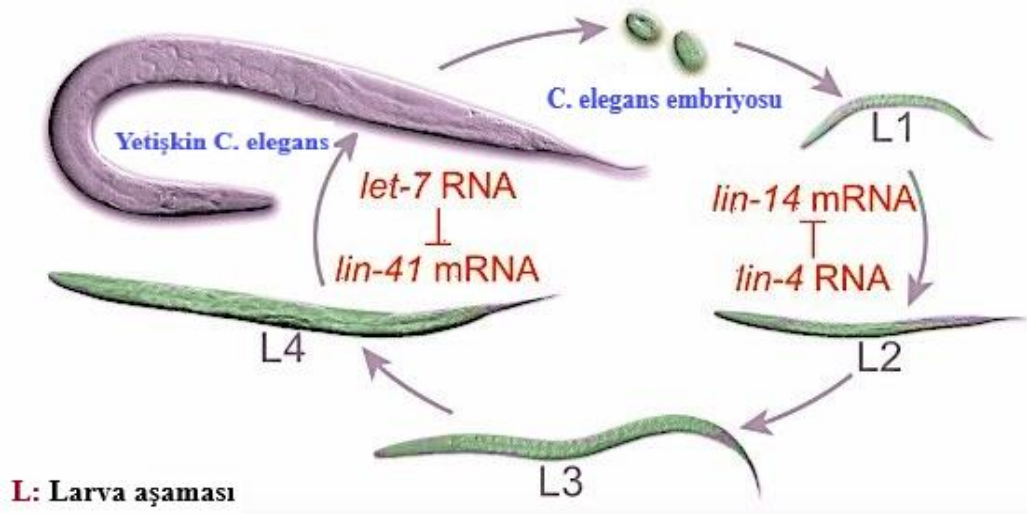
AML, çevresel faktörlerin yanı sıra genetik faktörlerin de etkisiyle gelişen malign bir lösemi türüdür. AML'yi etkileyen birçok faktörün olması, çok heterojen olan bu hastalığın tedavi sürecini de zorlaştırmakta ve etkileri her hastaya göre değişmektedir. Bugüne kadar yaygın olarak kullanılan geleneksel tedavi olan yoğun kemoterapiye bağlı (7+3) Sitarabin + Antrasiklin tedavisi veya hipometilasyon ajanları kullanılmaktadır ve bunun devamında konsolidasyon (pekiştirme) tedavisi önerilmektedir (81,90,91). Ancak AML hasta grubunun sıklıkla yaşlı popülasyondan oluşması ve ilaçların yüksek toksisiteye neden olmasının yanı sıra hastalığın heterojen olması tedaviyi oldukça sınırlamıştır (92,93). Bu tedavilere ek olarak hematopoietik kök hücre nakli ve allojenik kök hücre nakli de alternatif tedavi olarak ön plana çıkmaktadır (90,94).

Tüm bu tedavi şekillerinin AML açısından sınırlı kalmasıyla birlikte son yıllarda hedefe yönelik tedavilerin yanı sıra çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmeye başlanmıştır. Mutasyona özgü hedefe yönelik tedaviler FLT3 inhibisyonu (Gilteritinib) (95), IDH1 (İvosidenib) ve IDH2 inhibitörleri (Enasidenib) (91,96), RAS yolu inhibitörleri (Selumetinib ve Trametinib) (97,98), KIT yolu inhibitörleri (Midostaurin ve Dasatinib) (99,100) ve TP53 (APR-246) (101) hedefli tedavilerdir. Tüm bu tedavi türlerinde genel amaç kombinasyon terapilerine ek olarak hedefe yönelik düzenlemelerdir. Apoptotik yolu hedefleme tedavileri (BCL2 (Venetoklaks) ve MCL1 inhibitörleri (Venetoklaks + S64315), MDM2 inhibitörleri (Idasanutlin)), antikör bazlı tedaviler, radyasyon tedavisi ve immünoterapi diğer tedavi çeşitlerindendir (102–105).

2.3. mikroRNA (miRNA)

mikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık olarak 18-22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve endojen tek sarmallı RNA'ların bir alt grubudur. miRNA'lar, hedef mesajcı RNA (mRNA)'ların 3' uçtaki translasyon olmayan bölgelerine (UTR) bağlanarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenlerler. Tüm insan genlerinin yaklaşık olarak %60 kadarını düzenlediği bilinen miRNA'ların her biri birden fazla geni hedefleyerek ifadelerini regüle edebilmektedir (106,107). miRNA'lar, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rollere sahip protein kodlayan genlerin ekspresyonlarını

düzenleyebildiklerinden başta kanser türleri olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde de rol oynadıkları bilinmektedir (106,108,109). Bazı miRNA türlerinin kanserin ilerleyişinde doğrudan rol aldığı, bazılarının ise tümör supresör görevi görüp kanser gelişiminde indirgeyici bir rol aldığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (110–112). miRNA’lardaki bu görev farklılıklarının sebebi miRNA’ların hedefledikleri mRNA’ların tümör supresör yada onkogen olarak işlev görmesidir. miRBase (Sürüm 22.1) verilerine göre bugüne kadar insanda tanımlanan yaklaşık 2000 civarında miRNA olduğu, toplam miRNA sayısının ise 38.589 olduğu bildirilmiştir. Ancak büyük bir kısmının spesifik fonksiyonları tam anlamıyla bilinmemektedir (113). 1990 yılında bir grup araştırmacı bitkiler üzerinde yaptıkları deneyde miRNA’ların genleri inhibe ettiğini bulmuş ancak mekanizmanın tam olarak anlaşılamaması üzerine rapor edilememiştir (114). 1993 yılında ise Lee, Feinbaum ve Ambros’un, *C. elegans* üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda bilinen ilk miRNA olan lin-4 keşfedilmiştir. Bu çalışmalarında lin-4’ün, lin-14 geninin 3’UTR bölgesine bağlanarak lin-14 geninin aşağı regülasyonunun sağlanmasıyla larva döneminin bitmesinde ve yetişkinlik dönemine geçilmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Bu keşif miRNA’ların genleri inhibe edip ekspresyonlarında değişim yapabildiklerinin ilk göstergesi olmuştur. İkinci miRNA olan let-7’nin de tıpkı lin-4 gibi larvanın gelişimsel dönemine ilerleyişinde rol aldığı ve bağlandığı genleri regüle edebildiği belirlenmiştir (Şekil 9) (115). 2002 yılında ise Calin ve arkadaşları keşfettikleri kromozom 13q14 bölgesindeki miR-15a ve miR-16-1 ifadesinin KLL hastalarında %68 oranında aşağı regüle edildiğini ve böylece miRNA’ların kanser üzerinde de etkisi olduğunu bildirmişlerdir (116). Tüm bu keşiflerden yola çıkılarak yapılan çalışmalarla binlerce miRNA keşfedilmiş ve bu miRNA’ların hücrel farklılaşma, apoptoz, kanser gelişimi, konak-patojen etkileşimleri ve proliferasyonda rol aldıkları ortaya çıkarılmıştır (117–119).

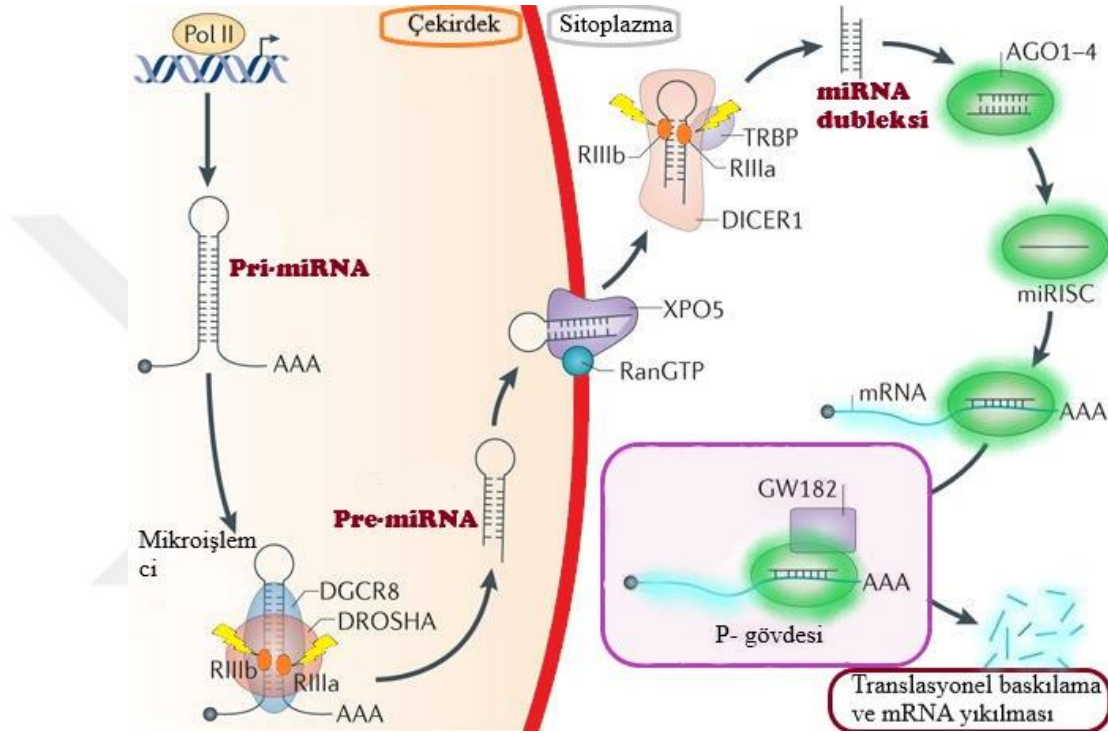


Şekil 9: Keşfedilen ilk miRNA'ların *C. elegans*'ın yaşam döngüsüne etkisi (120)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.3.1. miRNA'ların Biyogenezi

Yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğuna sahip miRNA'lar, 3'UTR bölgelerinden bağlandıkları hedef mRNA'larının transkripsiyonunu engelleyerek gen ekspresyonunda regülatör rol oynamaktadırlar. Bir miRNA'nın gen regülasyonunda rol oynayabilmesi için bazı biyogenez süreçlerinden geçmesi gerekmektedir. Bu süreçler çekirdekte başlayıp sitoplazmada sonlanmaktadır. Çekirdekte bulunan miRNA genleri 5' başlık (cap) ve 3' poliadenillenmiş olarak RNA polimeraz II tarafından kopyalanmakta ve böylece 1-4 kb uzunluğundaki birincil miRNA (pri-miRNA)'lar oluşmaktadır (121–123). Uzun zincirli pri-miRNA'lar mikroişlemci olarak adlandırılan DROSHA (RNase III enzimi) ve onun kofaktörü olan DiGeorge sendromu kritik bölge 8 (DGCR8) tarafından yaklaşık 60-100 nükleotid uzunluğunda bölünerek küçük bir saç tokasına benzeyen öncül miRNA (pre-miRNA) üretilir (124,125). Üretilen pre-miRNA'lar Exportin-5 (XOP5) ve kendisinin kofaktörü olan RanGTP aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya aktarılan pre-miRNA'lar diğer bir RNase III enzimi olan DICER1 tarafından işlenir ve TRBP (transaktivasyona duyarlı RNA bağlayıcı protein) ile halkasal yapı 3' ve 5' uçlarından yaklaşık olarak 18-22 nükleotid uzunluğunda kesilerek dubleks olgun bir miRNA halini alır (126–128). Dubleks halini alan bu yapı helikaz enzimi aracılığıyla iki parçaya ayrılır. Ardından olgun tek iplikli miRNA bağlandığı Argonat

(AGO) proteini ile birlikte RNA aracılı susturma kompleksi (RISC, RNA Induced Silencing Complex)’ni oluşturur (129–131). Oluşan miRISC kompleksi daha sonra hedef mRNA’lara yönlendirilerek hedef mRNA’ların post-translasyonel olarak baskılanması yada degrade olmasını sağlar (Şekil 10) (132,133). Böylece hedef mRNA’ya ait ekspresyon seviyesi azaltılarak regüle edilmiş olur (134,135).



Şekil 10: miRNA biyogenez (136)’dan değiştirilerek alınmıştır.

2.3.2. miRNA’ların Kanserdeki Rolü

Günümüzde hem solid hem de hematolojik kanser türleri için miRNA’ların kanserin patogeneğinde ve progresyonunda etkin rol oynadıkları bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda miRNA’ların hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez, migrasyon ve invazyon gibi çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulundukları ortaya çıkmıştır (107,137,138). Kanser sürecinde miRNA’lar, hedefledikleri genlerin fonksiyonuna göre onkogenik veya tümör baskılayıcı (tümör supresör) roller üstlenebilmektedir (139). miRNA’ların kanser üzerindeki etkisine ilk kanıt Calin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada KLL hastalarının %68’inde miR-15a ve miR-

16-1'in aşığı regüle edildiğinin bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. Tümör baskılayıcı özellik gösteren bu miRNA'ların azalması normalde hedefleyerek ifadesini baskıladıkları onkogenlerin ekspresyonlarının baskılanamamasına ve buna bağılı olarak da kanserli hücre artışının hızlanmasına katkı sağlamaktadır (116). İlk olarak KLL'de gösterilen miRNA kanser ilişkisi zamanla farklı kanser türlerinde de tespit edilmiştir. Akciğer kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada sağlıklı kontroller ile akciğer kanseri hastaları kıyaslandığında, kanserli hastalarda let-7'nin ekspresyon seviyesinde ciddi bir azalma olduğu ve bu aşığı regülasyonunun da kanser gelişimine zemin hazırladığı ortaya çıkarılmıştır (140). Bu çalışmaya ek olarak başka bir çalışmada ise sağlıklı kontroller ve akciğer hastalarının akciğerlerinde let-7 ekspresyon seviyesi incelenmiştir ve let-7 ekspresyon seviyesinin kanser hastalarında %50 daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur. Let-7 ekspresyon seviyesinin düşmesi ise hedef geni olan RAS proteinin miktarını artmasına neden olmuştur. Sonuçta ise onkogenik rol oynayan RAS proteininin artmasına bağılı olarak kanser gelişimi devam etmiştir (141). Kolon kanserinde ise normale kıyasla azaldığı bilinen miR-34a, miR-143 ve miR-145 miRNA'larının hücrede mimik transfeksiyonu yoluyla arttırılmasının, kanser gelişimini indirgeyici etki gösterdiği bildirilmiştir (142,143). Yumurtalık kanserinde azalmış miR-199, miR-140 seviyeleri ve artmış miR-21, miR-200a ve miR-200b seviyeleri tespit edilirken prostat kanserinde ise miR-627 ve miR-99b'nin aşığı regüle olmasının kanser patogeneğinde etkili olduğu bildirilmiştir (144–147). Literatüde meme kanserinde miR-10b ve miR-125b seviyelerinin azaldığı ve miR-21 ve miR-155 seviyelerinin ise arttığı belirtilmiştir (148–150). Pankreas kanserlerinde ise miR-21, miR-198, miR-33a ve let-7'nin önemli miRNA'lar olduğu bildirilmiştir (151–153). miRNA'ların solid kanserler üzerindeki etkilerinin yanı sıra hematolojik kanserler üzerinde de etkisi bulunmaktadır. NK/T hücreli lenfomalarda, miR-155 ve miR-21 ekspresyon seviyelerinin artmasının lenfomanın büyüme ve gelişmesine katkı sağladığı buna karşın tümör supresör rol oynayan miR-150'nin ise lenfoma gelişimini azalttığı bildirilmiştir (154,155). Klasik Hodgkin Lenfoma üzerine yapılan çalışmada ise miR-135a'nın azalmasıyla JAK2 geninin ekspresyonunun arttığı ve buna bağılı olarak da apoptozun azalıp hücre proliferasyonunun tetiklendiği belirtilmiştir (156). Multiple myelom üzerine yapılan bir çalışmada ise tümör supresör özellik gösteren miR-15 ve miR-16'nın miktarı arttığında bu miRNA'lar hedef genlerinden olan CABIN1 geninin ifadesinin azalmasına yol açmıştır ve böylece multiple myelom hücre gelişimi ve çoğalmasının engellenebildiği vurgulanmıştır (157). KML ve

ALL’de normale kıyasla aşağı regüle olan miR-7’nin hücrede miktarının arttırılmasıyla kanser hücre proliferasyonunun inhibe olduğu apoptozun ise tetiklendiği bilinmektedir (158,159). Sonuç olarak miRNA’ların tüm kanser türlerinde etkili olabileceği ve hücredeki miktarlarında meydana gelen değişikliklerin birçok hücresel süreci etkileyerek tümör gelişimini pozitif veya negatif yönde regüle edebileceği çok sayıda bilimsel çalışma ile gösterilmiştir.

2.3.3. miRNA ve AML İlişkisi

Özellikle yetişkinlerde sıklıkla görülen ve anormal blast hücrelerinin aşırı birikimiyle karakterize olan AML gelişiminde etkili genetik ve epigenetik faktörler anlaşılmasıyla hastalığın oluşum ve ilerleyişinde oldukça etkili olmaktadır. Genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimler anormal hücre popülasyonunun oluşmasında rol oynamaktadır. Bu genlerin ekspresyon değişimlerinin birçok sebebi olmakla beraber özellikle o genleri hedefleyerek ifadelerini düzenleyen ve genlerin ifadesinin artması veya azalmasını sağlayan küçük kodlanmayan RNA (miRNA)’lar bulunmaktadır. miRNA’lar evrimsel olarak korunan ve yaklaşık olarak 18-22 nükleotidlik küçük protein kodlamayan RNA’lardır. Geçmişten günümüze kadar açığa çıkarılan birçok rolü olmakla beraber özellikle kanser gelişimi ve ilerleyişi bakımından etkin rol oynamaktadırlar. Yapılan çalışmalarla birlikte miRNA’ların deregülasyonlarındaki değişimlerin AML ve alt tiplerinin gelişimi ve ilerleyişi açısından ilişkili olduğu gösterilmiştir (160). miRNA’ların tümör supresör ve onkogen olarak görev yapması löseminin gelişim süreçlerini etkilemekte ve potansiyel tedavi üretimine de katkı sağlamaktadır. Onkogenik miRNA’lar olan miR-375, let-7a-3 ve miR-378 AML hastalarının büyük bir kısmında yukarı regülasyon göstermektedir ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (161–163). miR-193b’nin AML’de tümör supresör olarak görev aldığını, düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğunu ve hücrenin hayatta kalmasının ve proliferasyonunun kontrolünü sağlayan MAPK sinyal yolunun düzenlenmesinde görev aldığı gösterilmiştir. Bu da miR-193b’nin potansiyel bir tedavi seçeneği ve belirteç olabileceğini göstermektedir (164). Son olarak miR-135a AML’de aşağı regülasyon gösterirken yukarı regülasyonu ile HOXA10 geni hedeflenerek hücresel proliferasyonun büyük bir kısmının inhibe edildiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (165).

2.3.4. miR-7-5p

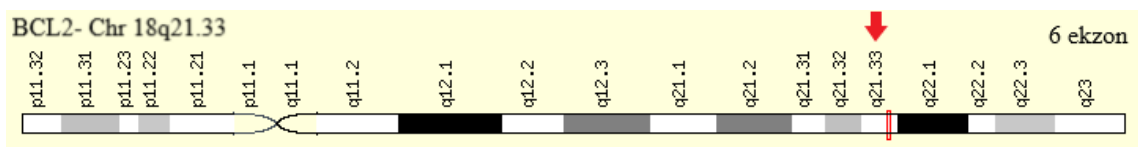
miR-7 yüksek oranda korunmuş olup miR-7-1, miR-7-2 ve miR-7-3 miRNA öncüsü tarafından üretilir (166,167). miR-7 özellikle tümör gelişimi, büyüme ve metastaz gibi kanser gelişim süreçlerinde indirgeyici rol oynadığı bildirilmiştir (168,169). miR-7-5p bu miRNA ailesinin en olgun ve en çok çalışılan üyesidir (167,170). miR-7-5p, 9q21 kromozom lokasyonunda bulunur ve 23 nükleotid uzunluğuna sahiptir (167). İlk kez 2001 yılında Lagos-Quintana tarafından bildirilen miR-7-5p, hedeflediği farklı genleri kullanarak çoklu sinyal yollarının etkin bir şekilde düzenlenmesinde görev alır (171,172). Yapılan çalışmalarda miR-7-5p'nin kolon (173), pankreas (170), melanoma (174), akciğer (175), meme (176), mide (177), karsinoma ve glioblastoma (178,179), lenfoma (180) ve lösemi türleri (181,182) olmak üzere çoğu kanser türlerinde aşağı regüle edildiğini ve çoğunlukla tümör supresör olarak görev aldığı bildirilmiştir. Çeşitli kanser türlerinde miR-7-5p'nin ifadesinin artması ile hücre proliferasyonuna, göç ve metastaza sebep olan onkogenik genlerin hedeflenmesiyle inhibasyonuna sebep olarak hücrel apoptozu teşvik etmektedir (183). Aynı zamanda epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'de de önemli rol oynamaktadır (183,184). Bu rolleriyle özellikle kanser tedavilerinde potansiyel hedef haline gelmektedir.

2.4. Tezde miR-7-5p ile İlişkisi Araştırılacak Genler

2.4.1. BCL2

B hücreli Lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2, BCL2), apoptozu inhibe ederek ve apoptozda görev alan bazı faktörleri de düzenleyerek kanserde hücrel canlılığın devamını sağlayan onkogenik, protein kodlayan bir gen ailesidir (185,186). BCL2 ve PPP1R50 olarak da bilinen BCL2 ilk olarak 1988 yılında ALL hastalığında keşfedilmiştir ve bu zamana kadar keşfedilen genlerin aksine bu genin hücrel programlanmış ölüm mekanizmasının düzenli çalışmasını teşvik etmek yerine hücrelerin hayatta kalmasını teşvik ettiği ve apoptozu durdurucu etki yaptığı ortaya çıkarılmıştır (187,188). BCL2 gen ailesi 18q21.33 kromozom lokasyonunda bulunur ve 6 ekzona sahiptir (Şekil 11) (189). Bu gen ailesinin yaklaşık olarak 25 üyesi mevcuttur ve anti-apoptotik ve pro-apoptotik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Genel olarak mitokondriyal dış zar geçirgenliğini düzenlerler

ve aynı zamanda bazı aile üyeleri hücrenin apoptoza girmesini sağlarken (pro-apoptotik) bazıları ise hücrelerin apoptoza girişinin engellemesini (anti-apoptotik) sağlarlar (190,191). BCL2 geninin kodladığı BCL2 proteinleri yapısında evrimsel olarak korunmuş BCL2 homoloji motifleri (BH) olarak bilinen 1'den 4'e kadar numaralandırılmış motifler içerir. Tüm BCL2 gen ailesi bu motiflerden bir veya daha fazlasına sahiptir ve gruplandırılırken 3 gruba ayrılırlar. Bunlar anti-apoptotik olarak bilinenler BCL2, BCL-W, MCL-1, BCL-XL BFL1, CED9 ve A1, pro-apoptotik olarak bilinenler BAX, BAK, BOK, BOO, BCLG, BCLB ve BCL-RAMBO ve son olarak yalnızca BH3 motifini içeren pro-apoptotik olarak bilinen BID, BIM, PUMA, NOXA, BAD, BMF, HR, HRK, BOXA, BCLG ve BIK proteinleridir. Diğerlerine oranla sadece BH3 motifine sahip olan pro-apoptotik aile üyeleri özellikle hücrel stres sinyallerine hemen cevap verirler ve apoptozu tetiklerler. Hücrenin apoptoza teşvikini ise pro-apoptotik aile üyelerini aktive ederek veya anti-apoptotik aile üyelerini inhibe ederek sağlarlar (186,192). BCL2 geni çoğu insan kanser türlerinde aşırı eksprese edilir. Buna ek olarak, BCL2 lösemi de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kemoterapiye karşı direnç oluşmasına sebep olmaktadır ve genellikle kanserin kötü prognozuyla ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (193,194). Benzer şekilde çoğu AML hastasında hastalığın ilerleyişi ve hücrelerin apoptozdan kaçması da yine BCL2 gen ailesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle BCL2 üzerinden apoptoz mekanizmalarının hedeflenmesiyle birlikte AML hastalarında yeni bir tedavi potansiyeli geliştirilebileceği literatürde önerilmektedir (195). BCL2 genini hedefleyen miRNA'ların ifadelerindeki deregülasyon sonucu veya çeşitli kromozomal değişiklikler yoluyla BCL2 ekspresyon seviyesinin aşırı artması gibi durumlar çok sayıda kanserin gelişiminde BCL2 geninin etkin rol oynamasının sebepleri arasında sayılmaktadır (196,197). Akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada BCL2'nin aşırı ekspresyon göstermesi kanserin ilerleyişinde büyük rol oynarken doğrudan hedefi olan miR-7 tarafından BCL2'nin 3'UTR bölgesine bağlanarak ekspresyon seviyesinin azaltıldığı ve hücre proliferasyonunun inhibe edildiği bildirilmiştir (198).

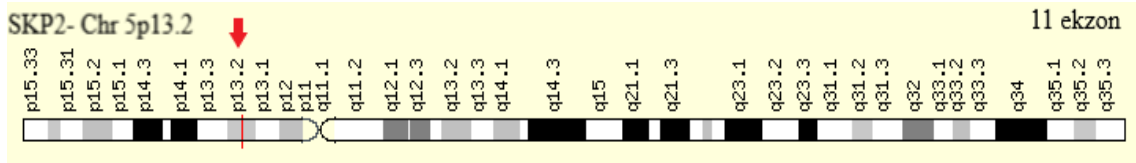


Şekil 11: BCL2 gen lokasyonu (199)'dan değiştirilerek alınmıştır.

2.4.2. SKP2

S fazı kinaz ilişkili protein 2 (S-Phase Kinase Associated Protein 2, SKP2), hücre döngüsünün regülasyonu, hücre proliferasyonunun sağlanması, hücrel farklılaşma ve apoptozun düzenlenmesinde görevli olan, yaklaşık 40 aminoasitlik F-Box proteinin substrat tanınmasında sorumlu olan E3 ligaz SKP1-cullin 1-F-box (SCF) protein kompleksinin önemli bir üyesidir (200,201). p45, FBL1, FLB1 ve FBXL1 olarak da bilinen SKP2, 5p13.2 kromozom lokasyonunda bulunan 11 ekzonlu bir proto-onkogendir (Şekil 12) (202). SKP2'yi ilk kez keşfeden Demetrick ve arkadaşları floresan in situ hibridizasyonu (FISH) tekniğini kullanarak bu geni 5p13 bölgesinde tanımlamışlardır (203). p57 (204), p27 (205), TOB1 (206), p130 (207), FOXO1 (208) ve p21 (209) olmak üzere 20'den fazla SKP2 spesifik substratları bulunmaktadır ve SKP2'nin büyük çoğunluğu tümör supresör olan bu substratlarının degradasyonu sebebiyle onkogenik faaliyet göstermektedir (200). SKP2 ve substratları çoğu kanser türlerinde ters regülasyon göstermektedir ve çoğunlukla SKP2 aşırı eksprese edilirken substratları ise degradasyon sebebiyle düşük ekspresyon seviyelerine sahiptirler. Prostat kanseri üzerine yapılan bir çalışmada SKP2 ekspresyon seviyesinin aşırı arttığı ve p27 ekspresyon seviyesinin ise SKP2'ye oranla düşük seviyede olduğu ve bu aşırı ekspresyon seviyesinin ise kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde meme kanseri (210), akciğer kanseri (211), pankreas kanseri (212), kolon kanseri (213), gastrik kanser (214), multipl myeloma (215), melanoma (216), lenfoma (217) ve lösemi türleri (218) de dahil olmak üzere kötü prognoz görülen birçok kanser türünde SKP2'nin aşırı ekspresyon seviyesine sahip olduğu, bu genin tümörögenizde ve ilaç direncinde de etkin rol oynadığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir. Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada SKP2'nin ekspresyon seviyesindeki artış kanser gelişimine katkıda bulunurken SKP2'nin doğrudan hedefi olan miR-7-5p'nin aşırı ekspresyon gösteren SKP2 aktivitesini tersine çevirerek meme kanseri gelişiminin indirgendiği ve EMT'nin tetiklenebildiği gösterilmiştir (219). Buna ek olarak AML hastaları üzerine yapılan bir çalışmada SKP2 ekspresyon seviyesinin hastalarda aşırı ekspresyon gösterdiği ve önemli derecede kötü prognozla ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (218). SKP2'nin onkogenik rolü çeşitli miRNA'larla hedeflenerek kanser tedavisine katkıda bulunulabileceği düşünülmektedir.

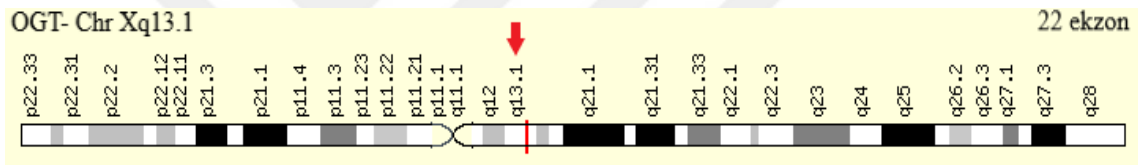
Şekil 12: SKP2 gen lokasyonu (220)'den değiştirilerek alınmıştır.



2.4.3. OGT

O-bağlı N-asetilglukozamin (GlcNAc) transferaz (O-Linked N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Transferase, OGT) geni Xq13.1 lokasyonunda yer alan, 22 ekzona sahip, X inaktivasyon merkezinin ve X-inaktif spesifik transkript (XIST) lokusunun yakınında bulunan ve O-GlcNAc transferazı (OGT) proteinini kodlayan bir gendir (Şekil 13) (221–223). Bakterilerden insana kadar çoğu canlıda evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur ve memeli gelişimi için gereklidir (224,225). OGT'ye ait ilk çalışma 1986 yılında Holt ve arkadaşları tarafından yapılmıştır ve OGT'nin özellikle nükleer zarf proteinlerinin üzerinde bol miktarda bulunduğu ve kromatin açısından oldukça zengin olduğu gösterilmiştir (226). OGT1, HRNT1, MRX106, XLID106, HINCUT-1 ve O-GLCNAC sinonim adlarıyla da anılan OGT geni, çeşitli transkripsiyon faktörleri, kinazlar, metabolik enzimler, fosfatazlar, insülin sinyalizasyonu, gen ekspresyonu ve regülasyonu, hücrel stres yanıt yollarının düzenlenmesi ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevli olup OGT ifadesinde düzensizleşme olması durumunda diyabet, kanser ve kardiyak komplikasyonların oluşabildiği bildirilmiştir (227–231). OGT'nin alternatif kırılma (splicing) sebebiyle 3 adet protein alt birimi bulunmaktadır. Bu alt birimler mOGT (mitokondriyal OGT), sOGT (kısa OGT) ve ncOGT (nükleositoloplazmik OGT)'dir. mOGT alt birimi mitokondriyal hedef dizisi içerir ve mitokondrial matrisi hedef alırken aynı zamanda pro-apoptotiktir (232,233). ncOGT sitoplazma ve çekirdekte bulunur. İçlerinde en uzun ve en yüksek protein özgül ağırlığına sahip olan alt birim ncOGT'dir (234,235). En kısa alt birim olan sOGT sitoplazma ve çekirdekte bulunur ve anti-apoptotiktir. sOGT aynı zamanda diğer alt birimlerin etkisini inhibe etme yeteneğine sahiptir (232,236). Her üç izoform da protein-protein etkileşimlerinde ve substrat tanımada görevli N-ucu tamamlanmış tetratrikopeptit tekrarları (tetratricopeptide repeats, TPR) içerirler. mOGT 9 (237), ncOGT 13 (234) ve sOGT ise 2 (237) TPR içerir. Ve her biri hedef peptidin ve UDP-GlcNAc bağlanma

paketinin bağlanması için gerekli katalitik bir alan paylaşırlar (237). Yapılan bir çalışmada OGT ve kodladığı O-bağlı-N-asetilglukozaminilasyon (O-GlcNAcylation) proteininin kanser oluşumunda ve metastazında görevli olduğu ortaya çıkarılmıştır (238). AML üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise O-bağlı-N-asetilglukozaminilasyon'un inhibe edilmesiyle birlikte AML hücrelerinde farklılaşma ve apoptoza yönelmenin arttığı görülmüştür. Bu nedenle de AML hastaları için potansiyel bir tedavi geliştirilmesine yönelik OGT'nin önemli bir potansiyel taşıyor olabileceği düşünülmüştür (239). Akciğer kanseri üzerine yapılan bir çalışmada OGT'nin kanser hücrelerinde aşırı eksprese olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, miR-7-5p'nin OGT'yi hedeflemesiyle OGT ifadesinin baskılanmasının sağlanabildiği bu sayede de kanser hücre gelişiminin ve büyümesinin azaltılabildiği önerilmiştir (240).

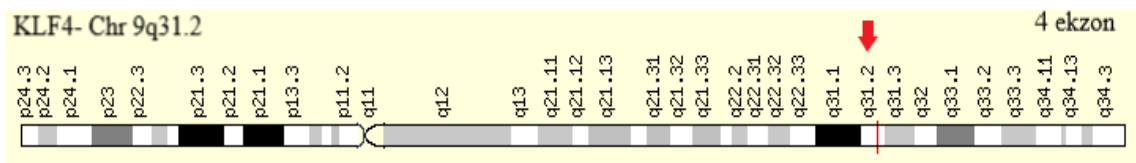


Şekil 13: OGT gen lokasyonu (241)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.4.4. KLF4

Krüppel benzeri faktör 4 (Krüppel like factor 4 KLF4), çoğalma, farklılaşma, hücrel geç, inflamasyon, homeostazın korunması, apoptoz ve embriyonik gelişim de dahil olmak üzere pek çok hücrel süreçte görev alan, guanin ve sitozin açısından zengin CACCC gibi diziler içeren evrimsel olarak korunmuş 3 adet çinko parmağa sahip bir transkripsiyon faktörüdür (242). Gen ekspresyon seviyesinde görülen deregülasyonun kanser gelişimine katkı sağladığı bildirilen KLF4 geni ilk olarak 1996 yılında Shields ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (243). EZF ve GKLF adlarıyla da bilinen KLF4, 9q31.2'de lokalize olup 4 ekzona sahip küçük bir gendir (Şekil 14) (244). Onkogen ve tümör supresör olarak bildirildiği farklı kanser türleri bildirilmiştir. Literatürde bu gen kolon (245), özofagus (246), mide (247), mesane (248), pankreas (249) ve akciğer (250) kanserlerinde tümör supresör olarak bildirilirken melanoma (251) osteosarkoma (252) B non-Hodgkin lenfoma (253) gibi malign tümör çeşitlerinde ise onkogen görevi gördüğü

belirtilmiştir. KLF4'ün diğer bir görevi ise indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSC'ler)'in indüklenmesi için gerekli 4 temel faktörden biri olmasıdır. iPSC'lerin yeniden programlanması ise kanser tedavilerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (254). miRNA'lar, histonların metillenmesi ve CpG adalarının hipermetilasyonları KLF4'ün kanser ve kök hücrelerin düzenlenmesinde ve tümör gelişiminde etkili mekanizmalardır. Tüm bu mekanizmalar KLF4'ün ekspresyonlarındaki değişimleri düzenlemektedir (255–257). Kolon kanseri üzerine yapılan çalışmada kolon kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilen KLF4 geninin miR-7-5p ile doğrudan hedeflenmesiyle, KLF4'ün ekspresyon seviyesinin düştüğü ve tümör büyümesi ile gelişiminin indirgendiği bildirilmektedir (5). Yapılan diğer bir çalışma ise T-ALL hastalarında KLF4 ekspresyon seviyesinin düşük olduğunu ve lösemi gelişiminin devam ettiğini göstermiştir ve KLF4'ün aşırı ekspresyonunun tetiklenmesiyle birlikte apoptozun indüklenebildiği belirlenmiştir (258). Aynı şekilde KML hastaları üzerine yapılan bir çalışmada ise KLF4'ün tümör supresör görevi gördüğünden bahsedilmektedir. KML'de KLF4 olmasına ek olarak bu genin ifadesinin yukarı regülasyonu ile anti-apoptotik olan BCL2'nin aşağı regülasyonunun ve bir pro-apoptotik olan BAX'ın yukarı regülasyonunun indüklenerek apoptozun teşvik edilebildiği gösterilmiştir (259). Hematolojik malignitelerden olan lösemide KLF4'ün kesin rolünün belirlenememiş olması ile birlikte çalışmalarda sonuçlar da farklılık göstermektedir. AML hastaları üzerine yapılan bazı çalışmalarda KLF4 tümör supresör olarak bildirilmişken (260,261) bazı çalışmalarda ise onkogen olarak (262,263) bildirilmiştir. AML ile ilgili yapılan başka bir çalışmada AML hücre hatlarında KLF4'ün ekspresyonunun AML hücre gelişimini desteklediği bildirilmektedir. Ancak KLF4'ün CRISPR - Cas9 yöntemiyle silinmesi sonucunda AML hücre büyümesinin ve hayatta kalmasının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (262). Tüm bu çelişkili sonuçların bildirilmiş olması nedeniyle KLF4'ün AML üzerindeki gerçek rolünün aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

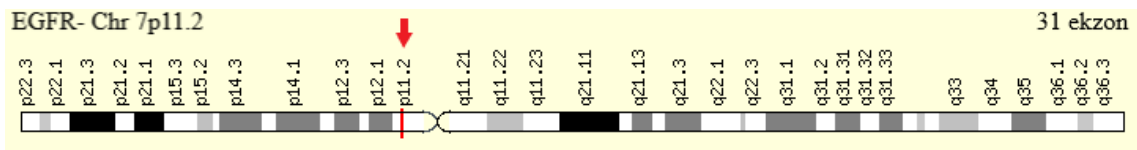


Şekil 14: KLF4 gen lokasyonu (264)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.4.5. EGFR

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanıp aktive edilmesiyle hücrelerin büyüme, gelişme, farklılaşma ve çoğalma gibi çeşitli biyolojik süreçlerinde etkin rol oynayan reseptör tirozin kinaz (RTK) olarak adlandırılan ErbB reseptör ailesinin bir üyesidir (265,266). EGF, 1962 yılında Dr. Stanley Cohen tarafından yeni doğan fareler ile yaptığı deneyde sinir büyüme faktörü (NGF) üzerine çalışılırken keşfedilmiştir (267). Bu keşif ile Dr. Stanley Cohen'e Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülü verilmiştir (268). ERBB, ERBP, HER1, mENA, ERBB1, PIG6 veya NISBD2 adlarıyla da bilinen EGFR, 7p11.2'de lokalizedir ve 31 ekzona sahip bir onkogendir (Şekil 15) (269). EGFR, transmembran alanı (TM), tirozin kinaz aktivitesine sahip olan hücre içi alan (ICD) ve hücre dışı alan (ECD) olmak üzere toplamda 3 adet alana sahiptir (270,271). Hücre dışındaki bir ligand önce EGFR'nin ECD alanından bağlanır ve bağlanmanın ardından ICD fosforillenir ve fosfatidil-inositol-3 kinaz (PI3K), rapamisinin memeli hedefi (mTOR), sıçan sarkom virüsü ve hızla hızlandırılmış fibrosarkom (RAF), mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERK'ler), Protein Kinase B (AKT) ve JAK/STAT gibi çeşitli sinyal yolları hücre büyümesi, çoğalması ve hayatta kalması, metastaz ve anjiyogenez gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesi için aktive edilir (272–274). En yaygın kullanılan sinyal yolları EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK yollarıdır. EGFR'nin aktive olması RAS protein seviyesinin aşırı artmasına sebep olabilmektedir. Seviyesi artan RAS proteini ise RAF'ı aktive edebilir, aktif RAF daha sonra MEK'i fosforile edebilir. Aktive edilmiş MEK ise son olarak ERK1/2'nin fosforillenmesini sağlayarak çekirdeğe doğru geçişini tetikleyebilmektedir. ERK'nin çekirdeğe geçmesiyle sitoplazmik proteinler fosforillenir ve böylece hücre proliferasyonunun, metastazın ve hücre göçünün gerçekleşmesi teşvik edilebilir (275,276). Bu gibi sinyal yollarının aktif bir şekilde kullanılması EGFR'nin kanser gelişimindeki rolünü açıkça göstermektedir. EGFR meme (277), akciğer (278), pankreas (279), gastrointestinal sistem (280), glioma (281), baş-boyun (282) ve beyin (283) gibi çoğu kanser türlerinde aşırı ekspresyon seviyesine sahiptir ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bunlara ek olarak lösemi türlerinde de artmış EGFR ekspresyonu gözlemlenmektedir. AML üzerine yapılan bir çalışmada kadın ve erkek hastalardan elde edilen verilerde artmış EGFR ekspresyonu bildirilerek kötü prognozla ilişkilendirilmiştir

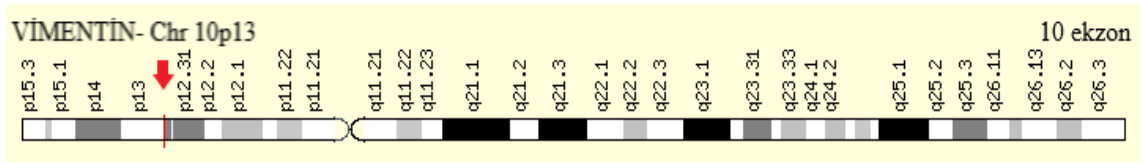
(284). miRNA'lar hem EGFR sinyal yolağında görev yapan ilişkili proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimlerden hem de EGFR'nin 3'UTR bölgesine bağlanarak EGFR sinyal yolundaki ekspresyon düzenlemesinden sorumludurlar. Ekspresyon seviyeleri değişen proteinler ve ilişkili faktörler kanser oluşumuna katkı sağlamaktadırlar (285,286). Papiller tiroid kanseri üzerine yapılan bir çalışmada EGFR ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu ve bu ifade artışının ise MAPK/ERK sinyal yolu aktivasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, azalmış olarak bildirilen miR-7-5p ifadesinin arttırılmasıyla sinyal yollarının ifadelerinin azaldığı ve hücre proliferasyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (287).



Şekil 15: EGFR gen lokasyonu (288)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.4.6. VIM

Vimentin (VIM), hücresel migrasyon, invazyon, adezyon ve göçten yani EMT süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynayan ve aynı zamanda hücresel stres süreçleri ile apoptozun ilerlemesinde görevli yüksek oranda korunmuş hücre iskeleti ağını oluşturan tip III ara filament (IF) ailesinin bir üyesidir (289,290). VIM geni 10p13 kromozomal lokasyonda bulunur ve 10 ekzona sahiptir (Şekil 16) (291). VIM, lenfosit hücrelerinde, epitelyal hücrelerde ve mezenkimal hücrelerde sıklıkla eksprese edilmektedir (292,293). Vimentin, sitoplazmada ve çeşitli hücre türlerinin etrafında bulunan hücre dışı boşlukta da yer alır ve hücre dışı boşlukta bulunan vimentin yüzey vimentini ve salgılanan vimentin olarak işlev görür (294). VIM geni tarafından kodlanan vimentin proteini hücre fonksiyonunun düzenlenmesi, hücre morfolojisinin korunması, yara iyileşmesi, bağışıklık ve iltihap oluşumu gibi süreçlerde de önemli görevlere sahiptir (295,296). Çeşitli kanser türlerinde EMT belirteci olarak kullanılan VIM geninin bazı solid tümörlerde artmış ifadesi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (297). AML üzerine yapılan bir çalışmada da benzer şekilde sitogenetik olarak normal karyotipe yani görünürde dengeli karyotipe sahip yaşlı AML hastalarında VIM ekspresyonunda görülen aşırı artmış ifade seviyesi kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (298).



Şekil 16: Vimentin gen lokasyonu (299)'dan değiştirilerek alınmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. HL60 ve NB4 hücre hatlarının temini

Çalışmada miR-7-5p'nin AML ile ilişkisinin araştırılmasına yönelik kullanılan HL60 AML hücre hattı Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ŞAP Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Bir diğer AML hücre hattı olan NB4 hücreleri ise Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'den alınmıştır.

3.1.2. Gereç ve Cihazlar

3.1.2.1. Tezde Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeleri

Tez çalışması boyunca İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı bünyesinde bulunan tüm laboratuvar olanaklarından faydalanılmıştır. Çalışma boyunca kullanılan tüm ekipman ve sarf malzemeleri Tablo 4'te listelenmiştir.

Tablo 4: Tezde kullanılan cihazlar, sarf malzemeleri ve kullanım yerleri

Adı	Kullanım Yeri
Gerçek Zamanlı PZR (LightCycler480-Roche)	qRT-PZR işlemleri
Spektrofotometre- NanoDrop- Thermo Sci	RNA saflığının belirlenmesi
İnvert Mikroskop-Olympus	Hücrelerin görüntülenmesi
Elektroforez aletleri, güç kaynakları / ThermoFisher	RNA kalitesinin belirlenmesi
Jel görüntüleme sistemi/Vilber Lourmat	PZR ürünlerinin görüntülenmesi ve kaydedilmesi

Adı	Kullanım Yeri
Soğutmalı Mikrosantrifüj- Hettich Rotina 420R	RNA izolasyonu
Isı döngü cihazı (Thermal Cycler)-BioRad	PZR ve cDNA sentezi
CO ₂ Inkübatör- Nüve	Hücre hatlarının çoğaltılması ve kültür işlemleri
(-80) Derin dondurucu- WiseCryo	Hücrelerin RNA örneklerinin ve reaktiflerin uzun süreli saklanması
(-20) Derin dondurucu-Vestel	Kit, reaktifler, solüsyonlar ve örneklerin saklanması
(+4) Buzdolabı- Vestel	Besi yeri ve solüsyonların saklanması
Microplate reader- BioTek	Hücre proliferasyonu ve apoptoz tayini
LightCycler plate	Gerçek Zamanlı PZR işlemleri (RealTime-PCR)
Laminar güvenlik kabini-Fagus	İn vitro deney uygulamaları ve qRT-PZR için gerekli reaksiyonların hazırlanması
T25 ve T75 flask (BD, USA)	Hücre kültürü işlemleri
96 Well Plate ve 6 Well Plate	Transfeksiyon işlemleri
Çok Kanallı Mikropipet- (ThermoFisher Sci.)	Çok örnekli reaksiyonların yapılması
Eppendorf tüpleri	Örneklerin saklanması ve deneylerde kullanılması
Vortex	Örneklerin karıştırılması
Soğuk blok	Deneyler sırasında reaktiflerin soğuk ortamda tutularak korunması
Parafilm	Tüp ve şişelerin kontaminasyondan korunması
Serolojik pipet ve pipetör	Büyük hacimli sıvıların aktarılması
4 µl,10 µl,100 µl,1000 µl mikropipet	Küçük hacimli sıvıların aktarılması

3.1.2.2. Tezde Kullanılan Solüsyonlar

Tezde kullanılan solüsyonlar Tablo 5-7’de listelenmektedir.

Tablo 5: Hücre kültüründe kullanılan solüsyonlar

Adı
RPMI 1640 besi yeri
Antibiyotik
Fetal Bovine Serum (FBS)
Phosphate Buffered Saline (PBS)
DMSO

Tablo 6: Transfeksiyon ve validasyonu için gerekli solüsyonlar

Adı
miR-7-5p mimik (5nmol, mirVana, ThermoFisher Sci.)
Lipofectamine 2000, 0.75 mL (ThermoFisher Sci.)
Opti-MEM™ Medyum
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Sci.)
TaqMan Universal Master Mix (ThermoFisher Sci.)
TaqMan miR-7-5p ve RNU43 primer ve problemleri (ThermoFisher Sci.)

Tablo 7: RNA izolasyonunda kullanılan solüsyonlar

Adı
TRIZOL REAGENT 100ML
İzopropanol
Chloroform 100 ML
Ethanol (%70’lik)
Nükleazsız su

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Hatlarını Çoğaltma, Pasajlama ve Dondurma İşlemleri

HL60 ve NB4 hücre hatları insan olgunlaşmış akut myeloblastik lösemi hücrelerinden türetilmiş hücre hatları olarak bilinmektedir ve AML çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. HL60 ve NB4 hücreleri uygun koşullar altında (37°C, %5 CO₂) ve %1 antibiyotik ile %10 Fetal Bovine Serum (FBS) eklenerek hazırlanan RPMI-1640 besi yerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan hücrelere ait 10x objektifte elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 17-18'de görülmektedir.

25 cm² hücre kültür flaskı içerine ekilerek çoğaltılan hücreler %70-80 yoğunluğa (konfluensiye) ulaşınca 75 cm²'lik daha geniş hücre kültür flaskına alınarak pasajlama işlemleri yapılmıştır. Pasajlama sırasında artan diğer hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurma (freezing) medyum (%10 DMSO içeren RPMI-1640 besi yeri) içerisine alınarak cryo tüplere konulmuştur. Ardından -196°C'deki azot tankında saklanmıştır.



Şekil 17: HL60 hücresi mikroskop görüntüsü (10x)



Şekil 18: NB4 hücresi mikroskop görüntüsü (10x)

3.2.2. Hücre Hatlarına miRNA Mimik Transfeksiyonu

HL60 ve NB4 hücre hatlarına miR-7-5p mimiği transfekte edilmiştir. Herhangi bir geni hedeflemediği bilinen non-targeting miRNA oligonüklotid dizisi ticari olarak satın alınarak çalışmada kontrol grubu hücrelerin (nt kontrol) hazırlanmasında kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemleri Lipofectamine-2000 protokolüne göre uygulanmıştır. Transfeksiyon için gerekli bileşenler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8: Transfeksiyon işleminde kullanılan bileşenler

BİLEŞEN
Hücre
Opti-MEM™ Medyum
Lipofectamine® 2000 Reagent
miRNA mimik

- Thoma lamı aracılığıyla hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra 6 kuyucuklu plate'lere her bir kuyucuğa 4×10^5 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır.
- Hücre ekiminden yaklaşık 24 saat sonra hücre yoğunluğu mikroskopta incelenmiş ve %70-80 konfluensiye ulaşan hücreler için transfeksiyon işlemlerine başlanmıştır.
- Lipofectamine™ 2000 reaktifi ve miRNA mimik/nt mimik Opti-MEM™ medyum içerisine total 30pmol olacak şekilde üretici firmanın protokolüne uygun olarak iki ayrı tüpte iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 5 dakikanın ardından mimik ve Lipofectamine tüpleri karıştırılarak oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübasyonun ardından RNA-lipid kompleksi elde edilmiştir ve %70-80 yoğunluğa ulaşmış hücelere transfekte edilmiştir.
- Hücreler ekspresyon deneyleri için 37°C %5 CO₂'li etüvde 24 saat kadar inkübe edilmiştir.
- Toplanan hücreler Trizol içerisine alınarak saklanmıştır ve daha sonra RNA izole edilmek üzere -80°C dolaba kaldırılmıştır.

3.2.3. RNA İzolasyonu

Uygun besi yerinde 37°C ve %5 CO₂'li etüvde çoğaltılan 24 saat öncesinde miR-7-5p ve nt mimik transfeksiyonu yapılmış olan HL60 ve NB4 hücreleri 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek pelletler Trizol solüsyonu (Ambion) içerisinde çözülerek üretici firmanın protokolüne uygun biçimde RNA izolasyonu yapılmıştır.

- 15 mL'lik falkon tüplere toplanılan hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- Süpernatant kısım atıldıktan sonra 1000 µL Trizol eklenerek çözülen pellet 1,5 mL'lik ependorf tüplere alınmıştır ve üzerine soğuk 100 µl kloroform eklenerek ardından vorteks aracılığıyla hızlıca karışması sağlanmıştır.
- +4°C soğutmalı santrifüjde 13000 rpm hızda 15 dk santrifüj yapılarak faz ayrımı elde edilmiştir.
- RNA'nın bulunduğu en üst faz olan şeffaf kısım temiz ependorf tüpe alındıktan sonra 500 µL soğuk isopropanol eklenmiştir.

- Buzda 5-10 dk inkübe edilen tüpler +4°C soğutmalı santrifüjde 13000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Elde edilen pellet üzerine 500 µl soğuk %70 Ethanol (EtOH) eklenmiştir.
- 4°C 12000 rpm’de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra pelletin kuruması için 10-15 dk oda sıcaklığında inkübasyon sağlanmıştır.
- 50 µl nükleaz içermeyen su (dH₂O) eklenerek pellet çözölmüştür.
- RNA konsantrasyon ve saflıkları NanoDrop 2000 spektrofotometre cihazında (ThermoFisher Sci.) ölçölmüştür.

3.2.4. Transfeksiyon Validasyonu İçin cDNA sentezi ve qRT-PZR İşlemleri

- Transfeksiyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediğinin kontrol edilmesi ve HL60 ve NB4 hücre hatlarına transfekte edilmiş miR-7-5p’nin hücrelerdeki ifade düzeyinin kontrolü amacıyla TaqMan primer ve problemleri’nin da kullanımıyla önce cDNA sentezi ardından qRT-PZR işlemleri yapılmıştır.
- Transfeksiyon validasyon işleminde çalışma ve kontrol grubunun her biri için total olarak 30 ng RNA kullanılarak öncelikle TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Sci.), miR-7-5p RT primeri (ThermoFisher Sci.) ve RNU43 RT primeri (ThermoFisher Sci.) ile üretici firmanın protokolüne uygun biçimde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA için gerekli bileşenler Tablo 9’da verilmiştir.
- Sonrasında TaqMan Universal Master Mix II (ThermoFisher Sci.), miR-7-5p RT probu (ThermoFisher Sci.) ve RNU43 RT probu (ThermoFisher Sci.) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun biçimde qRT-PZR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler duplike olacak şekilde çalışılmıştır ve elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile analiz edilmiştir. Bu aşama için gerekli olan bileşenler ve kullanılan miktarlar Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 9: cDNA sentezi için gerekli bileşenler ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/μL	1 μl
10X Reverse Transcription Buffer	1,5 μl
100mM dNTPs (with dTTP)	0,15 μl
RNase Inhibitor, 20U/μL	0,19 μl
Nuclease-free water	4,16 μl
Template RNA (15 ng/ μl)	5 μl
TaqMan® MicroRNA Primer	3 μl

Tablo 10: qRT-PZR için gereken bileşenler ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
TaqMan® Universal Master Mix II	10 μl
dH ₂ O	7 μl
TaqMan® MicroRNA Prob	1 μl
cDNA	2 μl

3.2.5. Hücresel Süreçlere miR-7-5p Etkisinin Araştırılması

3.2.5.1. Proliferasyona Etkisi

- 96 kuyulu plate'lere 3 tekrarlı ve her bir kuyucuğa 3×10^3 hücre olacak şekilde ekilen hücreler 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir.
- 24 saat sonra Lipofectamine 2000 protokolüne göre hücrelere miR-7-5p ve nt mimik transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon yapılan hücrelerin proliferasyonunun belirlenmesi amacıyla 48. ve 72. saatlerde hücre canlılığı değerlendirilmiştir. MULTISKAN FC micro plate (ThermoFisher Sci.) okuyucu cihaz kullanılarak hücrelerin proliferasyonu Cell Viability Detection Kit (CVDK) (Eco-tech Biotechnology NutriCulture) ile üretici firmanın protokolüne göre işleme alınarak 450 nm absorbansta ölçülmüştür.

3.2.5.2. Apoptoza Etkisi

NB4 hücreleri uygun koşullar altında (37°C, %5 CO₂) çoğaltıldıktan sonra 2×10^5 hücre 6 kuyucuklu plate'e ekilmiştir. Lipofectamine 2000 Reagent kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre transfeksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Transfeksiyondan 24 saat sonra miR-7-5p'nin hücreler üzerinde apoptoza olan etkisini incelemek üzere miR-7-5p ve nt mimik transfekte edilen hücreler falkon tüplerde toplanarak santrifüj edilmiştir. PBS ile yıkanan hücre pelleti tekrar santrifüj edilmiş ve supernatant kısmı atılmıştır. Ardından Human Caspase 3 Instant ELISA Kit (Invitrogen, ThermoFisher Sci.) protokolünde önerildiği gibi 1 mL lysis buffer ile çözülen pellet 2 mL'lik ependorf tüplere alınarak 60 dakika boyunca hafif düzeyde bir çalkalayıcı (EcoTech, BioTechnology) aracılığıyla oda sıcaklığında tutulmuştur. Ardından 1000xg hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve elde edilen hücre lizatı temiz tüplere alıgotlanarak deney yapılınca kadar -80°C soğutucuda saklanmıştır. Kit protokolünde önerildiği şekilde deney için hazırlanmış strip kuyularındaki solüsyon erimeden hem standart kontrol kuyularına hem de örneklerle ait 3 tekrarlı olarak belirlenen kuyulara 140 µL distile su ilave edilmiştir. Örneklerle ait kuyulara önceden hazırlanan ve -80°C soğutucuda saklanan lizatlar eritilerek ilgili kuyuya 10 µL olacak şekilde eklenmiştir. Plate cover ile kuyuların üzeri sıkıca kapatılarak 3 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde tutulmuştur. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kit protokolüne uygun şekilde önceden hazırlanan ve +4°C'de tutulan Wash buffer (1x) kullanılarak yıkama işlemleri tamamlanmıştır. Kuyucukların içindeki sıvının tamamen kuruması sağlandıktan sonra 100 µL Tetramethyl-benzidine (TMB) Substrat Solüsyonu eklenerek 15-20 dakika karanlık ortamda tutulmuş ve MULTISKAN FC micro plate okuyucu (ThermoFisher Sci.) aracılığıyla 620 nm absorbansta Standart 1 kuyusundaki OD okumasının 0.9–0.95'e ulaşp ulaşmadığı kontrol edilmiştir. Bu değere ulaşıldığı görüldüğünde reaksiyonu durdurucu solüsyondan 100 µL her bir kuyuya ilave edilerek bu kez 450 nm absorbansta okuma alınarak veriler kaydedilmiştir.

Apoptoz testi için kullanılan solüsyonlar ve miktarları Tablo 11'de listelenmiştir.

Tablo 11: Apoptoz testi için kullanılan solüsyonlar ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
Wash Buffer (1x)	Total 400 µL
TMB Substrat Solüsyonu	100 µL
Durdurma solüsyonu	100 µL
Lysis Buffer	1 mL
dH ₂ O	140 µL

3.2.6. miR-7-5p'nin Olası Hedef Genlerinin İn Silico Olarak Tespiti

miR-7-5p olası hedef genlerinin belirlenmesi sürecinde öncelikle miRDB, miRTarBase, Targetscan, miRWalk gibi in silico programlar aracılığıyla olası hedef genlerin listeleri çıkarılmıştır. Ardından en yüksek hedef skoruna sahip genlerden başlanarak her bir gen için literatür taraması yapılmıştır. Bu literatür taramasında seçilen genlerin AML'de yüksek ifade düzeyine sahip olmalarına dikkat edilmiştir. AML'de yüksek ifade düzeyine sahip olan ve in silico programda miR-7-5p'nin olası hedef geni olarak belirlenen BCL2, SKP2, OGT, KLF4, EGFR genleri bu şekilde seçilmiştir. Daha sonra qRT-PZR'da miR-7-5p transfekte edilmiş hücre hatlarındaki ifade düzeylerinin incelenmesi amacıyla literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan hedef genlere ait primer dizileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda seçilen genlere ait forward ve reverse primer dizilerinde mismatch ve SNP olup olmadığına SNPCheck programı ile bakılmış olup ardından UCSC In-Silico PCR programı aracılığıyla primer bağlanma sıcaklıklarına bakılmıştır. Genlere ait forward ve reverse primer dizilerinde herhangi bir mismatch ve SNP bulunmayan ve primer bağlanma sıcaklıkları birbiriyle aynı veya birbirine çok yakın derecede olan diziler bu çalışma için seçilmiştir. Son olarak çalışmada kullanılacak forward ve reverse primer dizilerinin insana ait genomda non-spesifik olarak herhangi bir bağlanma yapıp yapmadığını kontrol amacıyla BLAST programı kullanılmıştır. Eşleştirme sonucunda hedef genlere spesifik ürün eldesi sağlandığı BLAST ile doğrulanan primer dizileri ilgili genlerin ifade düzeylerinin araştırılması amacıyla qRT-PZR için kullanılmıştır.

3.2.7. Gen İfadelerinin Belirlenebilmesi İçin cDNA sentezi

miR-7-5p ve nt mimic transfekte edilen HL60 ile NB4 hücrelerine ait RNA örneklerinden total olarak 1000 ng RNA kullanılarak RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (ThermoFisher Sci.) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

- Her bir ependorf tüpe Tablo 12’de listelenmiş olan bileşenler sırasıyla ve istenilen miktarlara göre eklenmiştir.

Tablo 12: cDNA sentezinde miks 1 tüpünün hazırlanması için gerekli bileşenler ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
RNase-free water	Miktarı değişken
RNA template	Miktarı değişken
Primer Oligo (-dT)	1 µl
Primer Random hexamer	1 µl

Tüm bileşenler eklendikten sonra karışımların bulunduğu ependorf tüpler 65°C’de inkübe edildikten sonra 5 dk süreyle buza alınmıştır.

- Tablo 13’de listelenmiş olan bileşenler farklı bir ependorf tüpte kit protokolünde belirtilen miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 13: Reaksiyon ürünlerinin (miks 2 tüpü) hazırlanması için gerekli bileşenler ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
5x Reaksiyon buffer	4 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µl
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL)	1 µl

- Ependorflara tüm bileşenler eklendikten sonra yavaşça pipetaj yapılarak karışımın homojen olarak dağıtılması sağlanmıştır.

- Hazırlanmış olan miks 1 üzerine miks 2 dağıtılarak pipetaj yapılmıştır. Tüm bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Termal ısıtıcı cihazda 60 dk 42°C/5 dk 25°C/5 dk 70°C koşullarında cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Gen İfadelerinin Belirlenebilmesi İçin qRT-PZR İşlemlerinin Yapılması

Tezde miR-7-5p ile ilişkisi incelenecek olan 6 adet genin ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla qRT-PZR tekniği kullanılmıştır. qRT-PZR işlemi 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne) protokolüne göre yapılmıştır. qRT-PZR, Tablo 14’de yer alan bileşenler kullanılarak uygulanmıştır ve deneyler 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Tablo 14: qRT-PZR işlemi için gereken bileşenler ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne)	4 µl
Forward Primer (10pmol/µL)	0,4 µl
Reverse Primer (10pmol/µL)	0,4 µl
Nükleazsız su	13,2 µl
cDNA	2 µl
Total	20 µl

miR-7-5p transfekte edilmiş HL60 ve NB4 hücrelerindeki in silico yöntemler olan miRTarbase, miRDB ve TargetScan gibi programlar ile belirlenmiş potansiyel hedef genler olan BCL2, SKP2, OGT, KLF4, EGFR genlerinin ile EMT sürecinde önemli bir gen olan VIM geninin ifade düzeylerine rölatif kantitasyon yöntemiyle bakılmıştır. β -aktin geni normalizasyon için kullanılmıştır. Hedef genlere ait primer çiftlerinin dizileri ve baz uzunlukları Tablo 15’de verilmiştir. Deneyler iki tekrarlı olarak yapılmış olup elde edilen veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

Tablo 15: Tezde ifade seviyeleri incelenen genlere ait primer dizileri

Genler	Dizi	Baz	Referans
BCL2-F	5'-GATGTGATGCCTCTGCGAAG-3'	20	(300)
BCL2-R	5'-CATGCTGATGTCTCTGGAATCT-3'	22	(300)
SKP2-F	5'-ATGCCCCAATCTTGTCCATCT-3'	21	(301)
SKP2-R	5'-CACCGACTGAGTGATAGGTGT-3'	21	(301)
OGT-F	5'-TGTCACCCTTGACCCAAACTT-3'	21	(302)
OGT-R	5'-GGCACGAAGATAAGCTGCCA-3'	20	(302)
KLF4-F	5'-CCCAATTACCCATCCTTCCTG-3'	21	(303)
KLF4-R	5'-GTCTTCCCCTCTTTGGCTTG-3'	20	(303)
EGFR-F	5'-ATGGTCAAGTGCTGGATG-3'	18	(304)
EGFR-R	5'-GAGGAAGGTGTCGTCTATG-3'	19	(304)
VIM-F	5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3'	20	(305)
VIM-R	5'-GCTTCCTGTAGGTGGCAATC-3'	20	(305)
BACTIN-F	5'-GCCTCGCCTTTGCCGATC-3'	18	(303)
BACTIN-R	5'-CCCACGATGGAGGGGAAG-3'	18	(303)

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 28 yazılımı kullanılmıştır. Çalışma grubu ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında Student's t test uygulanmış ve analiz sonucuna ait veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde belirtilmiştir. qRT-PZR sonuçlarının rölatif kantitasyon analizinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanılmıştır. İstatistiki olarak $p < 0,05$ olan veriler anlamlı kabul edilmiştir. Grafik çizimlerinde ve figürlerin düzenlenmesinde GraphPad Prism 9.3 yazılımı, Microsoft Excel ve Paint programlarından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. RNA İzolasyonu

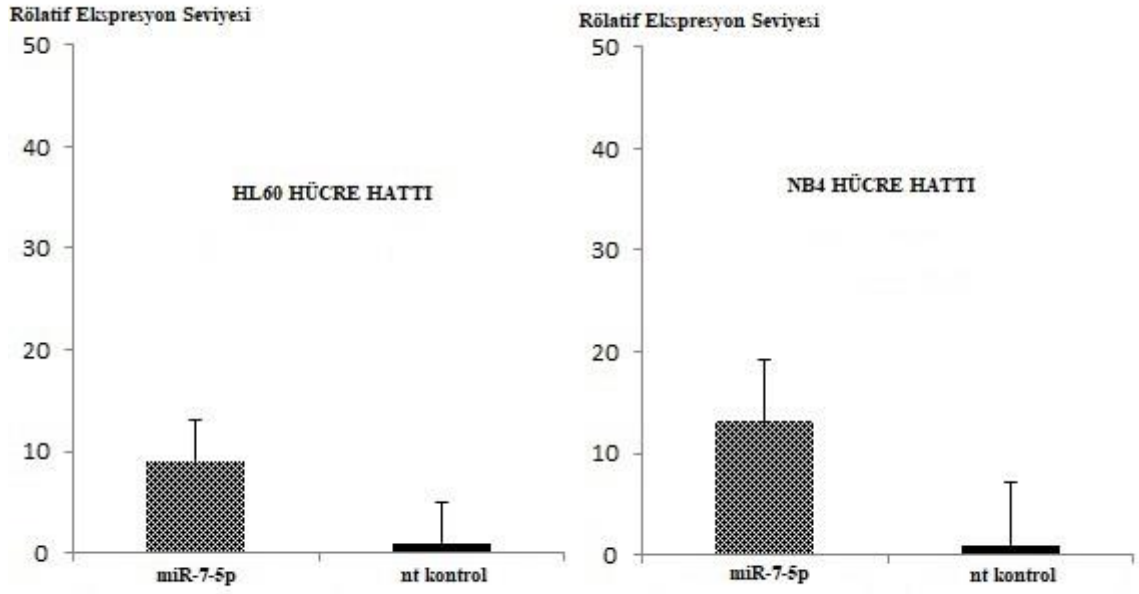
miRNA mimik transfekte edilen hücrelerde transfeksiyonun doğrulanarak sonrasında incelenecek genlerin ifadelerinin tespit edilebilmesi için gerçekleştirilen RNA izolasyonu sonucunda elde edilen konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 16'da belirtilmiştir.

Tablo 16: Hücrelere ait RNA konsantrasyon ve saflık değerleri

RNA Örneği	Konsantrasyonu (ng/ μ L)	Saflığı
HL60-miR-7-5p	269,1	1,95
HL60-nt kontrol	776,3	2,03
NB4-miR-7-5p	285,6	1,89
NB4-nt kontrol	997,2	2,02

4.2. miRNA Mimik Transfeksiyonunun Validasyonu

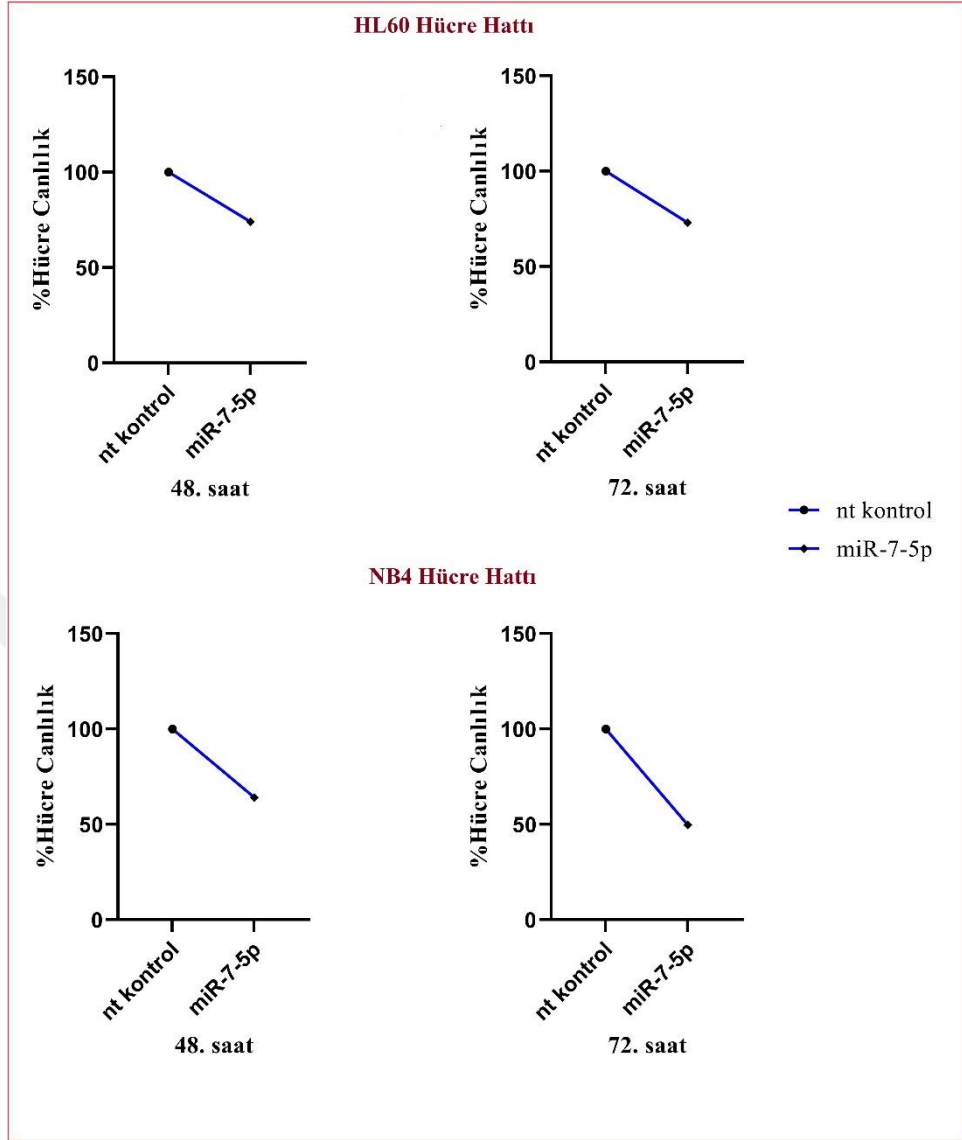
HL60 ve NB4 hücrelerine Lipofectamine aracılı yöntemler transfekte edilmiş olan miR-7-5p ve nt kontrol mimik miktarının hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı ve transfeksiyonun başarıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19: miRNA mimik transfekte edilmiş HL60 ve NB4 hücrelerine ait transfeksiyon validasyonu

4.3. Hücre Proliferasyonuna miR-7-5p Etkisi

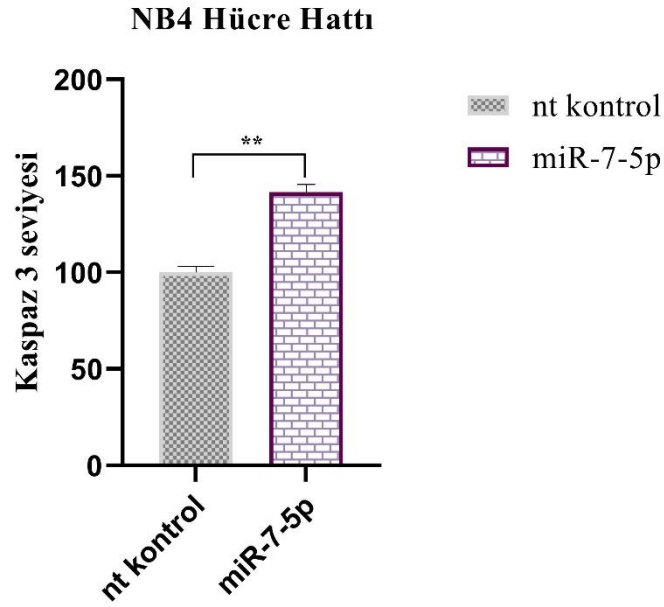
Hücrelerin proliferasyonuna miR-7-5p'nin etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen hücre proliferasyonu deneyi sonucunda HL60 ve NB4 hücrelerinde miR-7-5p transfekte edilen grupta nt kontrol gruba kıyasla hem 48. saatte ($p=0,04$; $p=0,01$, sırasıyla) hem de ve 72. saatte ($p=0,028$; $p=0,002$, sırasıyla) hücre çoğalmasında anlamlı düzeyde azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 20).



Şekil 20: HL60 ve NB4 hücrelerindeki 48. ve 72. saatteki proliferasyon değişimleri

4.4. Apoptoza miR-7-5p Etkisi

miR-7-5p'nin apoptoz sürecine etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen Kaspaz-3 seviyesinin değerlendirildiği Kaspaz-3 deneyi sonucunda NB4 hücresinde miR-7-5p transfekte edilen grupta nt kontrol gruba kıyasla hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı anlaşılmıştır ($p=0,003$) (Şekil 21).

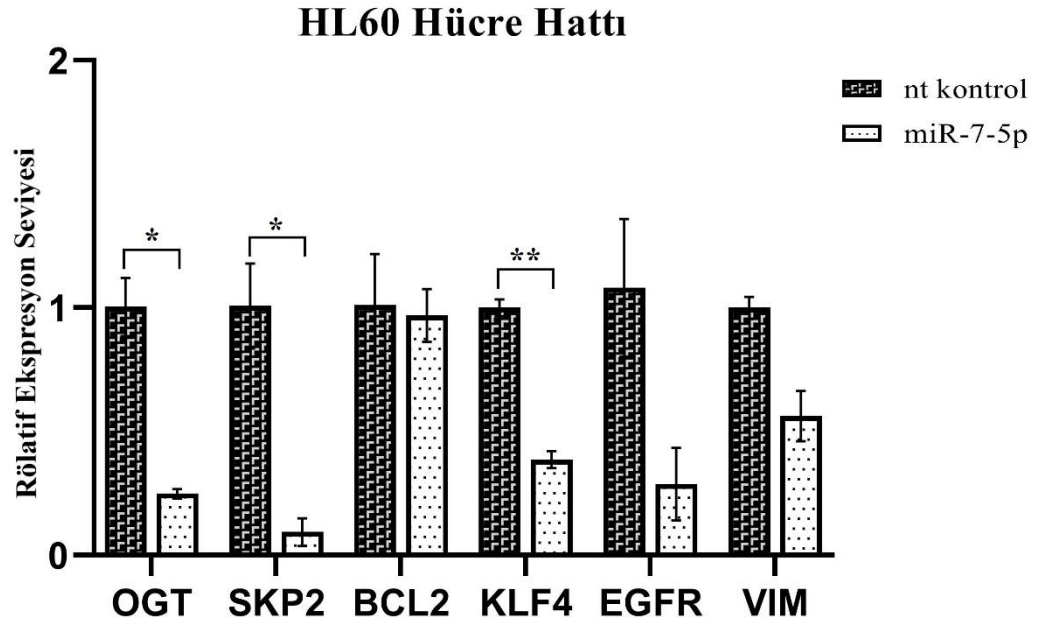


Şekil 21: NB4 hücrelerinde miR-7-5p'nin apoptoza etkisi (** $p < 0,01$)

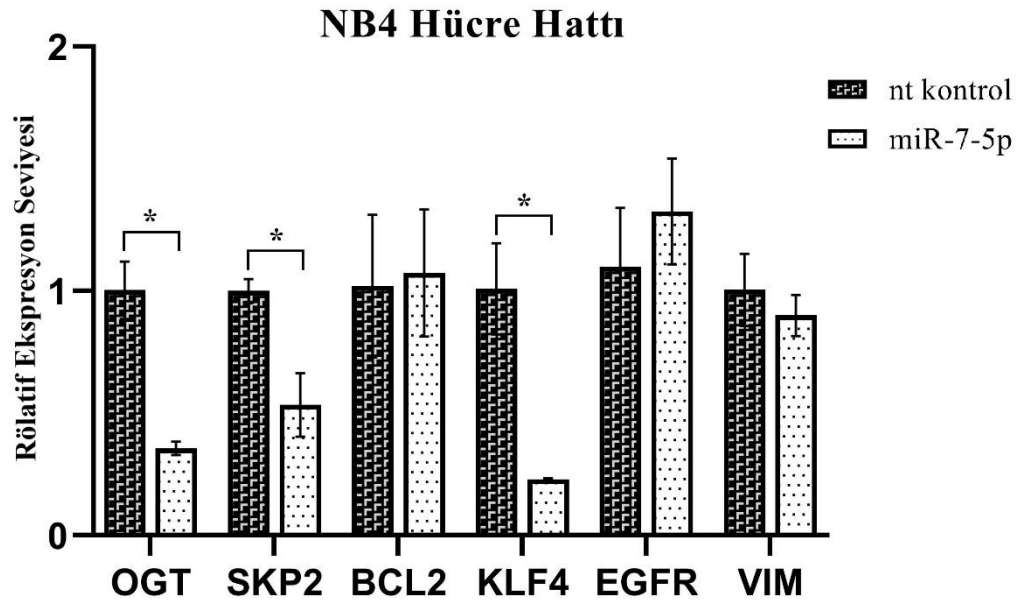
4.5. OGT, SKP2, BCL2, KLF4, EGFR ve VIM Genlerinin Ekspresyon Seviyelerine miR-7-5p Etkisi

miR-7-5p'nin olası hedefi olarak belirlenen OGT, SKP2, BCL2, KLF4 ile EGFR genleri ve EMT belirteci olarak bilinen VIM geninin ekspresyon düzeylerine bakılması amacıyla gerçekleştirilen qRT-PZR sonucunda elde edilen ekspresyon verileri rölatif kantitasyon yöntemi ile değerlendirilirken normalizasyon için β -aktin geni kullanılarak Student's t testi ile analiz edilmiştir. Analizlerde elde edilen p değerleri 0,05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilirken 0,05'ten büyük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir.

Sonuç olarak, HL6 ve NB4 hücre hatlarında OGT ($p=0,012$; $p=0,017$), SKP2 ($p=0,019$; $p=0,036$) ve KLF4 ($p=0,003$; $p=0,027$) genlerinin rölatif ifade düzeylerinin miR-7-5p transfekte edilen grupta nt kontrol gruba kıyasla anlamlı seviyede azaldığı tespit edilmiştir. Buna karşın her iki hücre hattında da BCL2 ($p=0,652$; $p=0,174$), EGFR ($p=0,201$; $p=0,698$) ve VIM ($p=0,179$; $p=0,472$) genlerinin rölatif ekspresyonlarında istatistiksel seviyede anlamlı bir değişimin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 22-23).



Şekil 22: HL60 hücre hattında OGT, SKP2, KLF4, BCL2, EGFR ve VIM genlerinin ekspresyon düzeyleri (* $p<0,05$, ** $p<0,01$)



Şekil 23: NB4 hücre hattında OGT, SKP2, KLF4, BCL2, EGFR ve VIM genlerinin ekspresyon düzeyleri (* $p<0,05$)

5. TARTIŞMA

Lösemi, kan üretiminde etkin rol oynayan kemik iliği ve hematopoietik organlardaki hücrelerin farklılaşmasından kaynaklanan bir kan kanseri türüdür (306,307). Lösemiler gelişim hızlarına ve köken aldığı hücelere göre iki ana gruba ayrılır. Hızlı bir yayılım gösteren lösemiler akut olarak adlandırılırken belirli bir sürede daha yavaş yayılım gösteren lösemi türleri ise kronik olarak adlandırılmaktadır.

AML, olgunlaşmamış myeloblast hücrelerinin kan ve kemik iliğinde aşırı birikimi ile karakterize ve çoğunlukla yetişkinlerde görülen hetererojen malign bir lösemi türüdür. SEER kanser verilerine göre AML görülme sıklığı her yıl her iki cinsiyet için de 100.000 kişide 4.3'tür ve en sık teşhis edilen yaş aralığı 65-74 yaştır (72,77).

Lösemiler de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin oluşum süreçlerinde etkin rol oynayan faktörlerden biri de miRNA'lardır. miRNA'lar yaklaşık 18-22 nükleotid uzunluğunda ve hedefledikleri mRNA'ların tamamen baskılanmasında veya susturulmasında rol oynayan küçük kodlanmayan RNA'lardır (308). miRNA'lar kanserler de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların oluşum süreçlerinde hem onkogenik hemde tümör supresör olarak işlev görmektedirler. Onkogenik miRNA'lar çeşitli kanser türlerinde aşırı ekspresyon gösterirken, tümör supresör miRNA'lar düşük ekspresyon seviyesine sahiptir. miRNA'ların hedef genlerindeki ifade düzeylerinin yeniden düzenlenmesi çeşitli hastalıklar için potansiyel tedavi alternatifleri sunmaktadır. Özellikle kanser türlerinde miRNA'ların ifadelerinin yeniden düzenlenmesi ile birlikte günümüzde kullanılan tedavilere ek olarak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine de büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda miRNA ifadelerinin yeniden düzenlenmesi ile birlikte onkogenik genler susturulmakta veya ifadesi azaltılmış tümör supresör genlerin yeniden eksprese edilmesi sağlanarak kanser gelişim sürecinde durdurucu bir etki yapması amaçlanmaktadır. Literatürde bu amaç ile çalışılan birçok miRNA bulunmakla birlikte miR-7-5p de bunlardan biridir. miR-7-5p yüksek oranda korunmuş olan miR-7 ailesinin en bilinen üyesidir (167). Bu miRNA'nın birçok kanser türünde tümör supresör görevi gördüğü ve kanser patogeneğinde indirgeyici rol aldığı bilinmektedir. Tiroid (309), pankreas (179), kolon (173), akciğer (310), glioblastoma (311), melanoma (312) ve meme (176) kanserlerinde düşük ekspresyon seviyesine sahip olan miR-7-5p'nin ifadesinin tam tersi duruma çevirilmesi ile birlikte kanserli hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve metastazında inhibe edici rollere sahip olduğu ve apoptozu

teşvik ettiği bildirilmiştir. Bu kanser türlerinin yanı sıra AML ile ilişkilendirilmiş yalnızca bir çalışma bulunmakta ve bu çalışmada yine miR-7-5p'nin tümör supresör rol üstlenerek hedef genlerinden biri olan OSBPL11 geninin hedeflenmesiyle AML gelişiminde inhibe edici görev aldığı ve apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir (182). Literatürde AML ve miR-7-5p'nin ilişkilendirildiği başka bir çalışmanın bulunmaması bizleri bu ilişkinin daha da araştırılması gerekliliğine yönlendirmiştir.

Literatüre bakıldığında miR-7-5p'nin çeşitli hücrel süreçler olan hücre proliferasyonunun, hücre büyümesinin, migrasyonun ve metastazın inhibe edilmesinde, apoptozun teşvik edilmesinde ve hücre döngüsünün kontrolünün sağlanmasında rol oynadığı akciğer kanseri (313) ve karsinoma (314) çalışmalarında gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında miR-7-5p mimik transfekte edilen HL60 ve NB4 hücre hatlarında kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunda anlamlı seviyede düşüş gözlenmiştir. Benzer şekilde gerçekleştirilen apoptoz deneyi sonucunda da miR-7-5p'nin kaspaz-3 miktarını arttırarak hücreleri apoptoza sürüklediği belirlenmiştir. Buradan yola çıkılarak AML'de kanser proliferasyon ve apoptoz süreçlerinde rol oynayabilecek miR-7-5p'nin bazı olası hedef genlerinin (BCL2, SKP2, OGT, KLF4, EGFR) ve EMT sürecinde etkili olduğu bilinen VIM geninin ifade seviyeleri HL60 ve NB4 hücre hatlarında incelenmiştir.

Potansiyel hedef genlerin belirlenmesi sürecinde (miRDB, miRTarBase, Targetscan, miRWalk) in silico programlarından yararlanılmıştır. Belirlenen bu genler literatürde oldukça sık araştırılan ve çoğu kanser çeşidinde yüksek ifade seviyesine sahip olan ve kanser patogeneğinde rol oynadığı bilinen önemli onkogenik genlerdir. miR-7-5p'nin olası hedef genlerinden olan SKP2, OGT ve KLF4 genlerinin ifade düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla miR-7-5p mimik transfekte edilen grupta nt kontrol mimik transfekte edilen gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma olduğu belirlenirken BCL2 ve EGFR genlerinin ifade düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı değişim olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca EMT belirteci olarak ifade değişikliği incelenen VIM geninde de istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişimi tespit edilmemiştir.

BCL2 gen ailesi pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar ve pro-apoptotik aile üyeleri apoptozu teşvik ederken aralarında BCL2'nin de bulunduğu anti-apoptotik aile üyeleri apoptozu inhibe ederler (188,315). Literatürde BCL2 ve miR-7-5p ilişkisinin araştırıldığı yumurtalık (316), rahim ağzı (6) ve meme (317) kanserlerinde BCL2 geninin miR-7-5p'nin doğrudan hedefi olduğu, BCL2'yi baskılayarak enerji tüketiminin azaltılmasıyla otofajinin teşvik edildiği ve kemoterapi

direncini tersine çevirebildiği gösterilmiştir. EGFR, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve büyümesinde aktif bir şekilde rol oynayan ve çeşitli dokularda eksprese olan reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir (318). Çeşitli hücresel süreçlerde aktif rol alması sebebiyle aşırı ekspresyon seviyesi tümörögenез ile ilişkilendirilmiştir (319). Literatürde EGFR ve miR-7-5p ilişkisi akciğer (320), yumurtalık (321) ve kolon (322) kanserlerinde incelenmiştir. Bu çalışmalarla miR-7-5p'nin EGFR'yi doğrudan hedefleyerek proliferasyon ile invazyonu inhibe ettiği ve aynı zamanda apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir.

Literatüre bakıldığında BCL2 geninin AML'de yüksek ifade düzeyine sahip olduğu ve genellikle kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (323,324). Aynı şekilde EGFR ve AML ilişkisi incelendiğinde tıpkı BCL2'de olduğu gibi EGFR de yüksek ekspresyon seviyesine sahiptir ve AML'de aşırı ifade edilen EGFR hücre proliferasyonunu tetikleyerek hücrelerin aşırı çoğalması ve bunun sonucunda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (284,325). Literatürde çeşitli kanser türlerinde miR-7-5p'nin BCL2 ve EGFR genlerinin hedeflenmesiyle kanser sürecinde etkili rol oynadığı bildirilmiş olmasına rağmen bu tez çalışmasında kontrol grubuna kıyasla miR-7-5p transfekte edilen AML hücrelerinde BCL2 ve EGFR genlerinin ifade seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmediği gözlenmiştir. Bu durumun çeşitli nedenleri olabilir; örneğin kanser türlerindeki heterojen yapının değişkenliği, hücredeki genomik instabilite farklılığı ve diğer birçok genetik ve epigenetik değişiklik gibi. Bu nedenle çalışma sonuçlarımıza göre AML hücrelerinde BCL2 ve EGFR genlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinde miR-7-5p dışında farklı miRNA ve diğer kodlamayan RNA'ların rol oynuyor olabileceği düşünülmüştür.

Tez çalışmasında anlamlı ifade değişikliği tespit edilen SKP2, F-box proteinini kodlayan ve özellikle hücre döngüsünün ilerlemesi ve düzenlenmesinde görevli olan aynı zamanda aşırı eksprese edildiği bilinen çeşitli kanser türlerinde tümör patogenezinde proto-onkogen olarak görev alan bir gen ailesidir (326). SKP2, prostat (327), B hücreli lenfoma (217), meme (328), kolon (329) ve akciğer (330) kanserlerinde olduğu gibi AML'de (218) de aşırı ekspresyon seviyesine sahiptir ve hücre döngüsünün ilerlemesine bağlı olarak tümör gelişimi, hücre proliferasyonu, metastaz ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda yüksek ekspresyon seviyesine sahip SKP2 geninin miRNA'lar tarafından hedeflenmesiyle ekspresyon seviyesinde düzenleme sağlanarak potansiyel tedavi stratejileri geliştirilebileceği düşünülmektedir. Yapılan

çalışmalarda SKP2 ve miR-7 ilişkisi doğrulanmıştır ve genellikle ters korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (331,332). Meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada SKP2 geninin kanserli hücrelerde aşırı ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve miR-7-5p seviyesinin ise düşük ifade düzeyine sahip olduğu bildirilmiştir. Yüksek ekspresyon seviyesine sahip olan SKP2 geninin ifadesinin miR-7-5p tarafından doğrudan hedeflenerek ilaca dirençli kanser hücrelerinde SKP2 ifadesi düşürülmüş olup bu hücrelerdeki EMT'nin de belli bir düzeyde tersine evirilebileceği, hücre proliferasyonunun inhibe edilip apoptozun teşvik edilebileceği bildirilmiştir (333). Aynı şekilde farelerin yumurtalık hücrelerinde yapılan bir çalışmada miR-7-5p'nin SKP2 genini hedefleyerek hücre döngüsünün durdurulmasını indüklediği ve bu yolla hücrelerin proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir (332). Bu çalışmalara ek olarak insan hepatoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada Schistosoma japonicum parazitine ait miR-7-5p'nin insan hepatoma hücrelerinde aşırı eksprese edilen SKP2 genini doğrudan baskılayarak hepatoma hücrelerinde büyümeyi indirgeediği ve migrasyonu baskıladığı gösterilmiştir (334). Bu tez çalışmasında da literatürle uyumlu olarak diğer kanser türlerinde olduğu gibi miR-7-5p ve SKP2'nin AML hücrelerinde de ters korelasyon göstererek kanser hücre gelişiminde indirgeyici rol oynadığı belirlenmiştir.

Tez çalışmasındaki bulgulara göre, ifade seviyesi istatistiksel olarak anlamlı değişim gösteren bir diğer gen olan OGT geni özellikle tümör oluşumunda görevli çeşitli proteinlerin düzenlemesinde ve kanser progresyonunda rol oynayan, birçok türde yüksek oranda korunmuş olan bir gendir (335,336). Bu genin çeşitli kanser türlerinde aşırı ekspresyon göstererek kanser gelişim ve ilerlemesine katkı sağladığı bildirilmiştir. Örneğin; karaciğer kanserinde miR-424-5p tarafından hedeflenen OGT'nin baskılanmasıyla tümör gelişimi ve metastazının inhibe edildiği bildirilmiştir (337). Başka bir çalışmada ise kolon kanserinde yüksek ifade düzeyine sahip olan OGT'nin kanser gelişimine ve ilerleyişine katkıda bulunduğu belirtilmiştir. OGT'nin ifade düzeyinin baskılanmasının ise hücre proliferasyonu, invazyonu ve metastazında görevli β -katenin ve E-kadherin ekspresyon seviyelerini düzenleyerek tümör gelişimini ve metastazını yavaşlattığı gösterilmiştir (338). İnsan glioblastomu üzerine yapılan bir çalışmada glioblastoma hücrelerinde OGT ekspresyonunun yüksek olduğu ve bunun da anjiyogeneze ve tümör oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. OGT'nin ifade düzeyi miR-7 tarafından hedeflendiğinde ise tümör büyümesinin ve anjiyogenezin tersine çevirilerek inhibe edildiği gösterilmiştir. Böylece OGT'nin miR-7'nin doğrudan hedefi olduğu, miR-7'nin

OGT'nin ifadesini 3'UTR bölgesine bağlanarak düzenlediği ve kanser patogeneğinde tümör supresör rol oynadığı belirlenmiştir (311). Akciğer kanseri üzerine yapılan diğer bir çalışmada da yine kanserli hücrelerde OGT'nin yüksek ekspresyon seviyesine sahipken miR-7-5p düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğu gösterilmiş olup OGT ve miR-7-5p ekspresyon seviyeleri tersine çevirildiğinde ise kanserli hücrelerin büyümesinin inhibe edildiği ve kanser progresyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir (240). Bu çalışmalara ek olarak AML üzerinde yapılan bir çalışmada OGT ifade düzeyinin AML hücrelerinde yüksek seviyede olduğu ve OGT'nin inhibe edilmesi ile birlikte hücre proliferasyonunun azaldığı, apoptozun arttığı gösterilmiştir (339). Bizim çalışmamızda da OGT ve miR-7-5p ilişkisi AML hücreleri üzerinde incelenmiş olup literatürdeki sonuçlar ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ifade seviyesi istatistiksel anlamlı değişim gösteren diğer gen ise çoğu kanser türünde onkogenik rol oynayan KLF4 genidir. Bu gen evrimsel olarak çoğu türler arasında korunmuş yapıya sahip, hücre döngüsünün kontrol, farklılaşma ve gelişim süreçlerinde görevlidir. KLF4 çeşitli kanser türlerinde onkogen veya tümör supresör olarak görev alan bir transkripsiyon faktörüdür (340–342). KLF4'ün birçok kanser türünde farklı görev alması o kanser türüne özgü farklı tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Kolon kanseri üzerine yapılan bir çalışmada KLF4'ün tümör supresör olarak rol oynadığı ve ifade düzeyinin artmasıyla birlikte bir tümör baskılayıcı olan NDRG2 ekspresyon seviyesinin artmasını tetikleyerek kanserli hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (343). Kolon kanseri üzerine yapılan ve KLF4'ün onkogenik bir rol oynadığı bildirilen diğer bir çalışmada ise miR-7-5p ile KLF4 ilişkisi doğrulanarak bu miRNA'nın kanserli hücrelerin migrasyonunu ve invazyonunu kısmi olarak azalttığı gösterilmiştir (5). KLF4'ün gastrointestinal kanserlerde düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve tümör supresör olarak rol oynadığı bildirilmiştir. KLF4'ün artan ifadesi ile hücre proliferasyonunu baskıladığı ve böylece kanser progresyonunu negatif olarak düzenlediği aynı çalışmada gösterilmiştir (344). Bunun yanı sıra meme kanseri üzerine yapılan bir çalışmada ise KLF4'ün onkogenik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Meme kanseri hücrelerinde yüksek KLF4 ekspresyonu gözlenmiş olup tümör gelişimine katkıda bulunduğu ve bunun sonucunda meme kanseri için prognostik bir belirteç olabileceği belirtilmiştir (345). Aynı şekilde cilt kanseri üzerine yapılan diğer bir çalışmada KLF4'ün tümörlü hücrelerde artmış ekspresyona sahip olduğu bildirilmiştir ve bu da hem erken hem de geç evredeki cilt kanserinde kötü prognoz ve

metastaz ile ilişkilendirilmiştir (346). KLF4'ün bu değişken ifade düzeyleri miRNA'ların da içinde bulunduğu çeşitli faktörlerle yeniden düzenlenebilmektedir. Literatürde AML üzerine yapılan bir çalışmada KLF4'ün yüksek ifade düzeyine sahip olduğu ve monositik farklılaşmayı teşvik ettiği gösterilmiştir (347). Bu sonuçlara bakıldığında, KLF4'ün değişken ifadesi aynı kanser türlerinde bile farklılık gösterebilmektedir ve bu değişime sebep olan mekanizmalar hala tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Bu durumun altında yatan mekanizmaların açığa çıkması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak miR-7-5p ve AML ilişkisinin HL60 ve NB4 hücrelerinde hücre proliferasyonu, gen ekspresyonu ve apoptoz deneyleri ile incelendiği çalışmamızda SKP2, KLF4 ve OGT genlerinin ekspresyonlarının miR-7-5p tarafından düzenlendiği mRNA seviyesinde tespit edilmiştir. Literatür verileri de incelendiğinde AML için erken tanı, prognoz takibi ve yeni tedavilerin geliştirilmesi gibi süreçlerde önemli potansiyele sahip olabilecek miR-7-5p'nin hedef genlerinin tespit edilerek doğrulama çalışmalarının yapılması oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle mRNA seviyesinde tespit ettiğimiz bu bulguların hem protein düzeyinde hem de hasta-kontrol örneklerinde doğrulanması ve miR-7-5p ile bu genlerin etkileşimlerinin de lusiferaz aktivite deneyleriyle gösterilmesi önemli olduğu için, miR-7-5p AML ilişkisinin tam anlamıyla aydınlatılabilmesine yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Greer J, Foerster J, Rodgers G, Paraskevas F, Glader B, Arber D.A, et al. Wintrobe's Clinical Hematology. 2009.
2. Vakiti A, Mewawalla P. Acute Myeloid Leukemia. 2022.
3. Narayan N, Bracken CP, Ekert PG. MicroRNA-155 expression and function in AML: An evolving paradigm. *Exp Hematol*. 2018;62:1–6.
4. Xin L, Liu L, Liu C, Zhou LQ, Zhou Q, Yuan YW, et al. DNA-methylation-mediated silencing of miR-7-5p promotes gastric cancer stem cell invasion via increasing Smo and Hes1. *J Cell Physiol*. 2020;235(3):2643–54.
5. Dong M, Xie Y, Xu Y. miR-7-5p regulates the proliferation and migration of colorectal cancer cells by negatively regulating the expression of Krüppel-like factor 4. *Oncol Lett*. 2019 Mar;17(3):3241–6.
6. Yang F, Guo L, Cao Y, Li S, Li J, Liu M. MicroRNA-7-5p Promotes Cisplatin Resistance of Cervical Cancer Cells and Modulation of Cellular Energy Homeostasis by Regulating the Expression of the PARP-1 and BCL2 Genes. *Med Sci Monit*. 2018 Sep 16;24:6506–16.
7. Yin CY, Kong W, Jiang J, Xu H, Zhao W. miR-7-5p inhibits cell migration and invasion in glioblastoma through targeting SATB1. *Oncol Lett*. 2019 Feb;17(2):1819–25.
8. <https://gco.iarc.fr/>, Erişim tarihi: 07.06.2020. WHO.
9. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>, Erişim tarihi: 07.06.2020. WHO.
10. Gavhane N, Shete S, Shinde R, Bhong K, Khairnar A, Yadav V. Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *International Journal of Pharma Sciences and Research*. 2. 2011.
11. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol*. 2000 Feb;13(2):193–207.
12. Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Annals of Oncology*. 2007 Feb;18:i3–8.

13. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2006 Nov;368(9550):1894–907.
14. Hájek R, Krejčí M, Pour L, Adam Z. Multiple myeloma. Vol. 24. *Klin Onkol*; 2011. 10–13 p.
15. Anderson KC, Carrasco RD. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:249–74.
16. Juliusson G, Hough R. Leukemia. *Prog Tumor Res*. 2016;43:87–100.
17. Mawardi H, Cutler C, Treister N. Medical management update: Non-Hodgkin lymphoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jan;107(1):e19-33.
18. Mugnaini EN, Ghosh N. Lymphoma. *Prim Care*. 2016 Dec;43(4):661–75.
19. Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of lymphoma diagnosis and management. *Radiol Clin North Am*. 2008 Mar;46(2):175–98, vii.
20. Haitham E. Elawad, Mohammed E. H. Ournasseir, Najem Aldin M. Osman, Mahjoob O. Mahjoob. A Monograph on Clues to the Etiology of Leukemia. *Journal of Perioperative & Critical Intensive Care Nursing*. 2019;5(1).
21. Behrmann L, Wellbrock J, Fiedler W. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look. *Frontiers in Oncology*. 2018 Oct 12;8.
22. Shephard EA, Neal RD, Rose PW, Walter FM, Hamilton W. Symptoms of adult chronic and acute leukaemia before diagnosis: large primary care case-control studies using electronic records. *British Journal of General Practice*. 2016 Mar;66(644):e182–8.
23. Thanh TTP, Vununu C, Atoev S, Lee SH, Kwon KR. Leukemia Blood Cell Image Classification Using Convolutional Neural Network. *International Journal of Computer Theory and Engineering*. 2018;10(2):54–8.
24. David Ah-Moye, Ceinwen Davies, Joanne Goody, Peter Hayward, Rebecca Frewin. Introduction to haematology and transfusion science. Vol. 26. 2016.
25. Wadleigh M, Dorfman DM, Skarin AT. Acute and Chronic Leukemias. In: *Atlas of Diagnostic Oncology*. Elsevier; 2010. p. 529–70.
26. Lanzkowsky P. Leukemias. In: *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Elsevier; 2011. p. 518–66.
27. Altman AJ. Chronic leukemias of childhood. *Pediatr Clin North Am*. 1988 Aug;35(4):765–87.

28. Davis AS, Viera AJ, Mead MD. Leukemia: an overview for primary care. *Am Fam Physician*. 2014 May 1;89(9):731–8.
29. Bennett J. H. Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J*. 1845;64:413–23.
30. Bennett J. H. On Leucocythemia, or White Cell Blood. *Monthly Journal of Medical Science*. 1852;5(28):331–45.
31. Virchow R. Weisses Blut. *Froriep's Notizen*. In: *Holland-Frei Cancer Medicine* Froriep's Notizen. 6th ed. Hamilton; 1845. p. 151–6.
32. Virchow R. Zur pathologischen Physiologie des Blutes. II. Weisses Blut. *Archives of Pathology, Anatomy and Physiology*. 1847;563–72.
33. Piller GJ. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *British Journal of Haematology*. 2001 Feb;112(2):282–92.
34. Diamantis A, Magiorkinis E, Androutsos G. Alfred François Donné (1801–78): a pioneer of microscopy, microbiology and haematology. *Journal of Medical Biography*. 2009 May 28;17(2):81–7.
35. Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia Research*. 2012 Jan;36(1):6–13.
36. Degos L. John Hughes Bennett, Rudolph Virchow... and Alfred Donné: the first description of leukemia. *Hematol J*. 2001;2(1):1.
37. Neumann E. Ein neuer fall von Leukämie mit erkrankung des knochenmarks. *Arch Heilkunde*. 1872;13:502–8.
38. Ehrlich P. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch Mikrosk Anat*. 1877;13(1):263–77.
39. Freireich EJ, Lemak N. *Milestones in Leukemia Research and Therapy*. Johns Hopkins University Press; 1991.
40. Freireich EJ. The history of leukemia therapy--a personal journey. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012 Dec;12(6):386–92.
41. BURCHENAL JH, MURPHY ML, ELLISON RR, SYKES MP, TAN TC, LEONE LA, et al. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood*. 1953 Nov;8(11):965–99.
42. Short NJ, Ravandi F. How close are we to incorporating measurable residual disease into clinical practice for acute myeloid leukemia? *Haematologica*. 2019;104(8):1532–41.

43. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2014 Nov;89(11):1063–81.
44. 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.
45. Tamamyan G, Kadia T, Ravandi F, Borthakur G, Cortes J, Jabbour E, et al. Frontline treatment of acute myeloid leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Feb;110:20–34.
46. Miller K, Pilichowska M. Acute Myeloid Leukemia. In: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier; 2014.
47. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Reviews*. 2017 Jan;31(1):63–76.
48. Handschuh L. Not Only Mutations Matter: Molecular Picture of Acute Myeloid Leukemia Emerging from Transcriptome Studies. *Journal of Oncology*. 2019 Jul 30;2019:1–36.
49. Mohamed MS, Elbadry MI, Yao CL. Stem-cell therapy with bone marrow (hematopoietic) stem cells for intestinal diseases. In: *The Intestine*. Elsevier; 2021. p. 131–45.
50. Rubnitz JE, Gibson B, Smith FO. Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010 Feb;24(1):35–63.
51. Saygin C, Carraway HE. Emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*. 2017 Dec 18;10(1):93.
52. Arceci RJ, Berman JN, Meshinchi S. Acute Myeloid Leukemia. In: *Cancer Genomics*. Elsevier; 2014. p. 283–300.
53. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–405.
54. Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 10;29(5):487–94.
55. Döhner K, Döhner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2008 Jul;93(7):976–82.

56. Assi SA, Imperato MR, Coleman DJL, Pickin A, Potluri S, Ptasinska A, et al. Subtype-specific regulatory network rewiring in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*. 2019 Jan 12;51(1):151–62.
57. Siveen KS, Uddin S, Mohammad RM. Targeting acute myeloid leukemia stem cell signaling by natural products. *Mol Cancer*. 2017;16(1):13.
58. Bohl SR, Bullinger L, Rücker FG. New Targeted Agents in Acute Myeloid Leukemia: New Hope on the Rise. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 23;20(8).
59. Hasserjian RP. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2013 Jun;35(3):358–66.
60. de Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.
61. Carlos Ortiz-Hidalgo. Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología Rev Latinoam*. 2013;51(1):58–69.
62. Freireich EJ, Wiernik PH, Steensma DP. The Leukemias: A Half-Century of Discovery. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Nov 1;32(31):3463–9.
63. Gaynon PS, Zomorodian TJ, Pinkel D. History of leukemia: historical perspectives. In: Pui CH, editor. *Childhood Leukemias*. Cambridge: Cambridge University Press; p. 1–20.
64. Ehrlich P. *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes*. Berlin: Verlag von; 1891.
65. Lagunas-Rangel FA, Chávez-Valencia V, Gómez-Guijosa MÁ, Cortes-Penagos C. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2017 Oct 1;11(4):328–39.
66. Boveri T. Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science*. 2008 Jan 1;121(Supplement_1):1–84.
67. Liesveld JL, Lichtman MA. Acute Myelogenous Leukemia. In: Kaushansky K, Lichtman M.A, Prchal J.T, Levi M.M, Press O.W, Caligiuri M(Eds.), editors. *Williams Hematology*. McGraw Hill; 2015.
68. NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 1961 Nov;27:1013–35.
69. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct;431(7011):931–45.

70. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999 Sep 30;341(14):1051–62.
71. Abdul G. Acute Leukemia Clinical Presentation. In: *Leukemia*. InTech; 2013.
72. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med*. 2016 Mar 5;5(3).
73. O'Donnell MR, Abboud CN, Altman J, Appelbaum FR, Arber DA, Attar E, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines Acute myeloid leukemia. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 Aug;10(8):984–1021.
74. Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018;43:8–15.
75. Hansrivijit P, Gale RP, Barrett J, Ciurea SO. Cellular therapy for acute myeloid Leukemia - Current status and future prospects. *Blood Rev*. 2019;37:100578.
76. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1999 Sep 30;341(14):1051–62.
77. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
78. Ostgård LSG, Nørgaard JM, Severinsen MT, Sengeløv H, Friis L, Jensen MK, et al. Data quality in the Danish National Acute Leukemia Registry: a hematological data resource. *Clin Epidemiol*. 2013;5:335–44.
79. Bekadja MA, Hamladji RM, Belhani M, Ardjoun FZ, Abad MT, Touhami H, et al. A population-based study of the epidemiology and clinical features of adults with acute myeloid leukemia in Algeria: report on behalf of the Algerian Acute Leukemia Study Group. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2011;4(4):161–6.
80. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer*. 2011 Nov 22;105(11):1684–92.
81. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
82. Chabner BA, Barnes J, Cleary J et al. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Serligsohn U, Prchal JT, editors. *Williams hematology*. 8th edition. New York: McGraw-Hill; 2010.

83. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976 Aug;33(4):451–8.
84. Ladines-Castro W, Barragán-Ibañez G, Luna-Pérez MA, Santoyo-Sánchez A, Collazo-Jaloma J, Mendoza-García E, et al. Morphology of leukaemias. *Revista Médica del Hospital General de México*. 2016 Apr;79(2):107–13.
85. Jaffe E, Harris N, Stein H, Vardiman J. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 3rd ed. France: Lyon; 2001.
86. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002 Oct 1;100(7):2292–302.
87. Hasserjian RP. Controversies in the recent (2016) World Health Organization classification of acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2021;34(1):101249.
88. 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 Jul 30;114(5):937–51.
89. Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. *Blood Res*. 2020 Jul 31;55(S1):S1–4.
90. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2018 Aug;392(10147):593–606.
91. Roboz GJ, DiNardo CD, Stein EM, de Botton S, Mims AS, Prince GT, et al. Ivosidenib induces deep durable remissions in patients with newly diagnosed IDH1-mutant acute myeloid leukemia. *Blood*. 2020 Feb 13;135(7):463–71.
92. Eleni LD, Nicholas ZC, Alexandros S. Challenges in treating older patients with acute myeloid leukemia. *J Oncol*. 2010;2010:943823.
93. Hassan C, Afshinnekoo E, Li S, Wu S, Mason CE. Genetic and epigenetic heterogeneity and the impact on cancer relapse. *Exp Hematol*. 2017;54:26–30.
94. Fleischmann M, Schnetzke U, Hochhaus A, Scholl S. Management of Acute Myeloid Leukemia: Current Treatment Options and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2021 Nov 16;13(22).

95. Perl AE, Martinelli G, Cortes JE, Neubauer A, Berman E, Paolini S, et al. Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory *FLT3* -Mutated AML. *New England Journal of Medicine*. 2019 Oct 31;381(18):1728–40.
96. Stein EM, DiNardo CD, Fathi AT, Pollyea DA, Stone RM, Altman JK, et al. Molecular remission and response patterns in patients with mutant-IDH2 acute myeloid leukemia treated with enasidenib. *Blood*. 2019 Feb 14;133(7):676–87.
97. Jain N, Curran E, Iyengar NM, Diaz-Flores E, Kunnavakkam R, Popplewell L, et al. Phase II study of the oral MEK inhibitor selumetinib in advanced acute myelogenous leukemia: a University of Chicago phase II consortium trial. *Clin Cancer Res*. 2014 Jan 15;20(2):490–8.
98. Ragon BK, Odenike O, Baer MR, Stock W, Borthakur G, Patel K, et al. Oral MEK 1/2 Inhibitor Trametinib in Combination With AKT Inhibitor GSK2141795 in Patients With Acute Myeloid Leukemia With RAS Mutations: A Phase II Study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(7):431-440.e13.
99. Paschka P, Schlenk RF, Weber D, Benner A, Bullinger L, Heuser M, et al. Adding dasatinib to intensive treatment in core-binding factor acute myeloid leukemia—results of the AMLSG 11-08 trial. *Leukemia*. 2018;32(7):1621–30.
100. Short NJ, Konopleva M, Kadia TM, Borthakur G, Ravandi F, DiNardo CD, et al. Advances in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: New Drugs and New Challenges. *Cancer Discov*. 2020;10(4):506–25.
101. Sallman DA, DeZern AE, Garcia-Manero G, Steensma DP, Roboz GJ, Sekeres MA, et al. Phase 2 Results of APR-246 and Azacitidine (AZA) in Patients with TP53 mutant Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):676–676.
102. Dinardo C, Takahashi K, Kadia T, Loghavi S, Naqvi K, Bose P et al. A phase 1b/2 clinical study of targeted IDH1 inhibition with ivosidenib, in combination with the BCL-2 inhibitor venetoclax, for patients with IDH1-mutated (MIDH1) myeloid malignancies. *Hemasphere*. 2019;3(97).
103. Ramsey HE, Fischer MA, Lee T, Gorska AE, Arrate MP, Fuller L, et al. A Novel MCL1 Inhibitor Combined with Venetoclax Rescues Venetoclax-Resistant Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Discov*. 2018;8(12):1566–81.

104. Stanchina M, Soong D, Zheng-Lin B, Watts JM, Taylor J. Advances in Acute Myeloid Leukemia: Recently Approved Therapies and Drugs in Development. *Cancers (Basel)*. 2020 Nov 1;12(11):3225.
105. Liu H. Emerging agents and regimens for AML. *J Hematol Oncol*. 2021;14(1):49.
106. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009 Jan;19(1):92–105.
107. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215–33.
108. Bajan S, Hutvagner G. Regulation of miRNA Processing and miRNA Mediated Gene Repression in Cancer. *MicroRNA*. 2014 Jul 31;3(1):10–7.
109. Reddy KB. MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell Int*. 2015;15:38.
110. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun;435(7043):834–8.
111. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006 Apr;6(4):259–69.
112. Park H, Huang X, Lu C, Cairo MS, Zhou X. MicroRNA-146a and MicroRNA-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting TRAF6 and IRAK1 Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2015 Jan;290(5):2831–41.
113. Persson H, Søkilde R, Häkkinen J, Pirona AC, Vallon-Christersson J, Kvist A, et al. Frequent miRNA-convergent fusion gene events in breast cancer. *Nature Communications*. 2017 Dec 5;8(1):788.
114. Ahmadzada T, Reid G, McKenzie DR. Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophysical Reviews*. 2018 Feb 11;10(1):69–86.
115. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec;75(5):843–54.
116. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Nov 26;99(24):15524–9.

117. Tzur G, Israel A, Levy A, Benjamin H, Meiri E, Shufaro Y, et al. Comprehensive Gene and microRNA Expression Profiling Reveals a Role for microRNAs in Human Liver Development. *PLoS ONE*. 2009 Oct 20;4(10):e7511.
118. Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008 Apr;20(2):214–21.
119. John Mendelsohn, Peter M. Howley, Mark A. Israel, Joe W. Gray, Craig B. Thompson. *The Molecular Basis of Cancer*. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2015.
120. Abdallah F, Pichon C. MicroRNAs in Skin Biology: Biogenesis, Regulations and Functions in Homeostasis and Diseases. *Immunome Research*. 2019;15(1).
121. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051–60.
122. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957–66.
123. Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Nov 6;104(45):17719–24.
124. Gregory RI, Yan K ping, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 7;432(7014):235–40.
125. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004 Nov 7;432(7014):231–5.
126. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005 May 1;6(5):376–85.
127. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep 15;431(7006):343–9.
128. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng Y. A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA*. 2012 Nov;18(11):2083–92.
129. Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016 Jan;1859(1):71–81.

130. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science* (1979). 2001 Aug 10;293(5532):1146–50.
131. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000 Mar 31;101(1):25–33.
132. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005 Aug 22;436(7051):740–4.
133. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell*. 2005 Nov;123(4):631–40.
134. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. 3rd ed. New York: Oxford University Press ; 2012.
135. Wu W, editor. *MicroRNA and Cancer*. Vol. 1699. New York, NY: Springer New York; 2018.
136. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015 Jun 22;15(6):321–33.
137. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):83–92.
138. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2016 Dec 28;1(1):15004.
139. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999–3004.
140. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 2004 Jun 1;64(11):3753–6.
141. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell*. 2005 Mar;120(5):635–47.
142. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in

- human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15472–7.
143. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003 Oct;1(12):882–91.
 144. Iorio M v., Visone R, di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. *Cancer Research*. 2007 Sep 15;67(18):8699–707.
 145. Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*. 2008 Jan 15;68(2):425–33.
 146. Zhang M, Wang F, Zhang X. miRNA-627 inhibits cell proliferation and cell migration, promotes cell apoptosis in prostate cancer cells through upregulating MAP3K1, PTPRK and SRA1. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(1):255–61.
 147. Suryakant Niture, Lucas Tricoli, Qi Qi, Sashi Gadi, Kala Hayes, Deepak Kumar. MicroRNA miR-99b-5p Targets mTOR/AR axis, Induces Autophagy, and Inhibits Prostate Cancer Cell Proliferation. *Research Square*. 2021;
 148. Iorio M v., Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Research*. 2005 Aug 15;65(16):7065–70.
 149. Ma L. Role of miR-10b in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Research*. 2010 Oct 26;12(5):210.
 150. Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008 Nov;14(11):2348–60.
 151. Qadir MI, Faheem A. miRNA: A Diagnostic and Therapeutic Tool for Pancreatic Cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2017;27(3):197–204.
 152. Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, et al. let-7 MicroRNA Transfer in Pancreatic Cancer-Derived Cells Inhibits *In Vitro* Cell Proliferation but Fails to Alter Tumor Progression. *Human Gene Therapy*. 2009 Aug;20(8):831–44.

153. Liang C, Yu XJ, Guo XZ, Sun MH, Wang Z, Song Y, et al. MicroRNA-33a-mediated downregulation of Pim-3 kinase expression renders human pancreatic cancer cells sensitivity to gemcitabine. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14440–55.
154. Yamanaka Y, Tagawa H, Takahashi N, Watanabe A, Guo YM, Iwamoto K, et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3265–75.
155. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011 Aug 19;25(8):1324–34.
156. Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2009 Oct 1;114(14):2945–51.
157. Zhang L, Zhou L, Shi M, Kuang Y, Fang L. Downregulation of miRNA-15a and miRNA-16 promote tumor proliferation in multiple myeloma by increasing CABIN1 expression. *Oncology Letters*. 2017 Nov 15;
158. Jiang M jie, Dai J uan, Gu D na, Huang Q, Tian L. MicroRNA-7 inhibits cell proliferation of chronic myeloid leukemia and sensitizes it to imatinib in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017 Dec;494(1–2):372–8.
159. Sun H, Zhang Z, Luo W, Liu J, Lou Y, Xia S. MiR-7 Functions as a Tumor Suppressor by Targeting the Oncogenes TAL1 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2020 Jan 1;19:153303382093413.
160. Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1121–9.
161. Wang Z, Hong Z, Gao F, Feng W. Upregulation of microRNA-375 is associated with poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biochem*. 2013 Nov;383(1–2):59–65.
162. Qian J, Lin J, Qian W, Ma J chun, Qian S xuan, Li Y, et al. Overexpression of miR-378 is frequent and may affect treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2013 Jul;37(7):765–8.

163. Li Y, Lin J, Yang J, Qian J, Qian W, Yao DM, et al. Overexpressed let-7a-3 is associated with poor outcome in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2013 Dec;37(12):1642–7.
164. 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. *J Clin Oncol.* 2018;36(10):1007–16.
165. Xu H, Wen Q. Downregulation of miR-135a predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and regulates leukemia progression via modulating HOXA10 expression. *Molecular Medicine Reports.* 2018 May 23;
166. Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpileva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *International Journal of Cancer.* 2010 Oct 15;127(8):1785–94.
167. Kalinowski FC, Brown RAM, Ganda C, Giles KM, Epis MR, Horsham J, et al. microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2014 Sep;54:312–7.
168. Marzioni M, Agostinelli L, Candelaresi C, Saccomanno S, de Minicis S, Maroni L, et al. Activation of the developmental pathway neurogenin-3/microRNA-7a regulates cholangiocyte proliferation in response to injury. *Hepatology.* 2014 Oct;60(4):1324–35.
169. Gu D na, Jiang M jie, Mei Z, Dai J uan, Dai C yun, Fang C, et al. microRNA-7 impairs autophagy-derived pools of glucose to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Letters.* 2017 Aug;400:69–78.
170. Zhu W, Wang Y, Zhang D, Yu X, Leng X. MiR-7-5p functions as a tumor suppressor by targeting SOX18 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;497(4):963–70.
171. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science (1979).* 2001 Oct 26;294(5543):853–8.
172. Eslamizadeh S, Heidari M, Agah S, Faghihloo E, Ghazi H, Mirzaei A, et al. The Role of MicroRNA Signature as Diagnostic Biomarkers in Different Clinical Stages of Colorectal Cancer. *Cell J.* 2018 Jul;20(2):220–30.

173. ZENG CY, ZHAN YS, HUANG J, CHEN YX. MicroRNA-7 suppresses human colon cancer invasion and proliferation by targeting the expression of focal adhesion kinase. *Molecular Medicine Reports*. 2016 Feb;13(2):1297–303.
174. Giles KM, Brown RAM, Epis MR, Kalinowski FC, Leedman PJ. miRNA-7-5p inhibits melanoma cell migration and invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013 Jan;430(2):706–10.
175. Xiao H. MiR-7-5p suppresses tumor metastasis of non-small cell lung cancer by targeting NOVA2. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24:60.
176. Shi Y, Luo X, Li P, Tan J, Wang X, Xiang T, et al. miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGγ. *Cancer Lett*. 2015 Mar 1;358(1):27–36.
177. Yang Z, Shi X, Li C, Wang X, Hou K, Li Z, et al. Long non-coding RNA UCA1 upregulation promotes the migration of hypoxia-resistant gastric cancer cells through the miR-7-5p/EGFR axis. *Experimental Cell Research*. 2018 Jul;368(2):194–201.
178. Liu Z, Liu Y, Li L, Xu Z, Bi B, Wang Y, et al. MiR-7-5p is frequently downregulated in glioblastoma microvasculature and inhibits vascular endothelial cell proliferation by targeting RAF1. *Tumor Biology*. 2014 Oct 16;35(10):10177–84.
179. Bi Y, Shen W, Min M, Liu Y. MicroRNA-7 functions as a tumor-suppressor gene by regulating ILF2 in pancreatic carcinoma. *Int J Mol Med*. 2017 Apr;39(4):900–6.
180. Sorrentino D, Frentzel J, Mitou G, Blasco RB, Torossian A, Hoareau-Aveilla C, et al. High Levels of miR-7-5p Potentiate Crizotinib-Induced Cytokilling and Autophagic Flux by Targeting RAF1 in NPM-ALK Positive Lymphoma Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 13;12(10):2951.
181. Li G, Gao L, Zhao J, Liu D, Li H, Hu M. LncRNA ANRIL/miR-7-5p/TCF4 axis contributes to the progression of T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell International*. 2020 Dec 23;20(1):335.
182. Jiang D, Wu X, Sun X, Tan W, Dai X, Xie Y, et al. Bone mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-7-5p inhibits progression of acute myeloid leukemia by targeting OSBPL11. *Journal of Nanobiotechnology*. 2022 Dec 10;20(1):29.

183. Fang Y, Xue JL, Shen Q, Chen J, Tian L. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2012 Jun;55(6):1852–62.
184. Okuda H, Xing F, Pandey PR, Sharma S, Watabe M, Pai SK, et al. miR-7 Suppresses Brain Metastasis of Breast Cancer Stem-Like Cells By Modulating KLF4. *Cancer Research*. 2013 Feb 15;73(4):1434–44.
185. Riedell PA, Smith SM. Double hit and double expressors in lymphoma: Definition and treatment. *Cancer*. 2018;124(24):4622–32.
186. Ebrahim AS, Sabbagh H, Liddane A, Raufi A, Kandouz M, Al-Katib A. Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Sep;142(9):2013–22.
187. Pegoraro L, Palumbo A, Erikson J, Falda M, Giovanazzo B, Emanuel BS, et al. A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov;81(22):7166–70.
188. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988 Sep;335(6189):440–2.
189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/596>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
190. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation. *Science* (1979). 1984 Nov 30;226(4678):1097–9.
191. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*. 1986 Oct;47(1):19–28.
192. Maes ME, Schlamp CL, Nickells RW. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. *Prog Retin Eye Res*. 2017;57:1–25.
193. Tóthová E, Fricova M, Stecová N, Kafková A, Elbertová A. High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma*. 2002;49(3):141–4.
194. Venditti A, del Poeta G, Maurillo L, Buccisano F, del Principe MI, Mazzone C, et al. Combined analysis of bcl-2 and MDR1 proteins in 256 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004 Aug;89(8):934–9.

195. Choi JH, Bogenberger JM, Tibes R. Targeting Apoptosis in Acute Myeloid Leukemia: Current Status and Future Directions of BCL-2 Inhibition with Venetoclax and Beyond. *Targeted Oncology*. 2020 Apr 21;15(2):147–62.
196. Zanesi N, Balatti V, Bottoni A, Croce CM, Pekarsky Y. Novel insights in molecular mechanisms of CLL. *Curr Pharm Des*. 2012;18(23):3363–72.
197. Pekarsky Y, Zanesi N, Croce CM. Molecular basis of CLL. *Semin Cancer Biol*. 2010 Dec;20(6):370–6.
198. Xiong S, Zheng Y, Jiang P, Liu R, Liu X, Chu Y. MicroRNA-7 inhibits the growth of human non-small cell lung cancer A549 cells through targeting BCL-2. *Int J Biol Sci*. 2011;7(6):805–14.
199. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCL2>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
200. Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jun;8(6):438–49.
201. Wang Z, Gao D, Fukushima H, Inuzuka H, Liu P, Wan L, et al. Skp2: A novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2012 Jan;1825(1):11–7.
202. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6502>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
203. Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human CDK2/cyclin A-associated proteins p19 (SKP1A and SKP1B) and p45 (SKP2). *Cytogenet Cell Genet*. 1996;73(1–2):104–7.
204. Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, Yada M, Ishida N, Imaki H, et al. Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10231–6.
205. Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol*. 1999 Jun 17;9(12):661–4.
206. Hiramatsu Y, Kitagawa K, Suzuki T, Uchida C, Hattori T, Kikuchi H, et al. Degradation of Tob1 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitination. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8477–83.
207. Tedesco D, Lukas J, Reed SI. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev*. 2002 Nov 15;16(22):2946–57.

208. Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JMA, et al. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1649–54.
209. Yu ZK, Gervais JL, Zhang H. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Sep 15;95(19):11324–9.
210. Signoretti S, di Marcotullio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest*. 2002 Sep;110(5):633–41.
211. Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, Koshikawa K, Iizasa T, Fujisawa T, et al. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am J Pathol*. 2002 Jul;161(1):207–16.
212. Einama T, Kagata Y, Tsuda H, Morita D, Ogata S, Ueda S, et al. High-level Skp2 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2006 May;32(4):376–81.
213. Chung YK, Chi-Hung Or R, Lu CH, Ouyang WT, Yang SY, Chang CC. Sulforaphane down-regulates SKP2 to stabilize p27KIP1 for inducing antiproliferation in human colon adenocarcinoma cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015 Jan;119(1):35–42.
214. Wei Z, Jiang X, Qiao H, Zhai B, Zhang L, Zhang Q, et al. STAT3 interacts with Skp2/p27/p21 pathway to regulate the motility and invasion of gastric cancer cells. *Cellular Signalling*. 2013 Apr;25(4):931–8.
215. Yang Y, Yan W, Liu Z, Wei M. Skp2 inhibitor SKPin C1 decreased viability and proliferation of multiple myeloma cells and induced apoptosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2019;52(5).
216. Zhao H, Pan H, Wang H, Chai P, Ge S, Jia R, et al. SKP2 targeted inhibition suppresses human uveal melanoma progression by blocking ubiquitylation of p27. *OncoTargets and Therapy*. 2019 May;Volume 12:4297–308.
217. Seki R, Okamura T, Koga H, Yakushiji K, Hashiguchi M, Yoshimoto K, et al. Prognostic significance of the F-box protein Skp2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *American Journal of Hematology*. 2003 Aug;73(4):230–5.

218. Min YH, Cheong JW, Lee MH, Kim JY, Lee ST, Hahn JS, et al. Elevated S-Phase Kinase-Associated Protein 2 Protein Expression in Acute Myelogenous Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2004 Aug 1;10(15):5123–30.
219. Wang HF, Dong ZY, Yan L, Yang S, Xu HN, Chen SL, et al. The N-terminal polypeptide derived from vMIP-II exerts its antitumor activity in human breast cancer through CXCR4/miR-7-5p/Skp2 pathway. *J Cell Physiol*. 2020;235(12):9474–86.
220. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SKP2>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
221. O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD. ogt -Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. *Molecular and Cellular Biology*. 2004 Feb 15;24(4):1680–90.
222. Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA. O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Apr;272(14):9316–24.
223. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8473>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
224. Shafi R, Iyer SP, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 23;97(11):5735–9.
225. Kreppel LK, Hart GW. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32015–22.
226. Holt GD, Hart GW. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1986 Jun 15;261(17):8049–57.
227. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Frontiers in Endocrinology*. 2013;4.
228. Wells L, Kreppel LK, Comer FI, Wadzinski BE, Hart GW. O-GlcNAc Transferase Is in a Functional Complex with Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Sep;279(37):38466–70.

229. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:825–58.
230. Wang YC, Peterson SE, Loring JF. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Research.* 2014 Feb 12;24(2):143–60.
231. Krause MW, Love DC, Ghosh SK, Wang P, Yun S, Fukushima T, et al. Nutrient-Driven O-GlcNAcylation at Promoters Impacts Genome-Wide RNA Pol II Distribution. *Frontiers in Endocrinology.* 2018 Sep 10;9.
232. Love DC, Kochran J, Cathey RL, Shin SH, Hanover JA. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *Journal of Cell Science.* 2003 Feb 15;116(4):647–54.
233. Shin SH, Love DC, Hanover JA. Elevated O-GlcNAc-dependent signaling through inducible mOGT expression selectively triggers apoptosis. *Amino Acids.* 2011 Mar 8;40(3):885–93.
234. Jinek M, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurralde E, Hanover JA, Conti E. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin α . *Nature Structural & Molecular Biology.* 2004 Oct 12;11(10):1001–7.
235. Lubas WA, Hanover JA. Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase. *Journal of Biological Chemistry.* 2000 Apr;275(15):10983–8.
236. Fletcher B, Dragstedt C, Notterpek L, Nolan G. Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression. *Leukemia.* 2002 Aug 1;16(8):1507–18.
237. Lazarus BD, Love DC, Hanover JA. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology.* 2006 May 1;16(5):415–21.
238. Slawson C, Hart GW. O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(9):678–84.
239. Asthana A, Ramakrishnan P, Vicioso Y, Zhang K, Parameswaran R. Hexosamine Biosynthetic Pathway Inhibition Leads to AML Cell Differentiation and Cell Death. *Mol Cancer Ther.* 2018;17(10):2226–37.

240. Woo SY, Lee SY, Yu SL, Park SJ, Kang D, Kim JS, et al. MicroRNA-7-5p's role in the O-GlcNAcylation and cancer metabolism. *Noncoding RNA Res.* 2020 Dec;5(4):201–7.
241. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OGT>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
242. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene.* 2017 May;611:27–37.
243. Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem.* 1996 Aug 16;271(33):20009–17.
244. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9314>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
245. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, Babbin BA, Lamb NE, Yang VW. Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene.* 2004 Jan 15;23(2):395–402.
246. Yang Y, Goldstein BG, Chao HH, Katz J. KLF4 and KLF5 regulate proliferation, Apoptosis and invasion in esophageal cancer cells. *Cancer Biology & Therapy.* 2005 Nov 27;4(11):1216–21.
247. Wei D, Gong W, Kanai M, Schlunk C, Wang L, Yao JC, et al. Drastic Down-regulation of Krüppel-Like Factor 4 Expression Is Critical in Human Gastric Cancer Development and Progression. *Cancer Research.* 2005 Apr 1;65(7):2746–54.
248. Ohnishi S, Ohnami S, Laub F, Aoki K, Suzuki K, Kanai Y, et al. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003 Aug;308(2):251–6.
249. Zammarchi F, Morelli M, Menicagli M, di Cristofano C, Zavaglia K, Paolucci A, et al. KLF4 is a Novel Candidate Tumor Suppressor Gene in Pancreatic Ductal Carcinoma. *The American Journal of Pathology.* 2011 Jan;178(1):361–72.
250. Fadous-Khalifé MC, Aloulou N, Jalbout M, Hadchity J, Aftimos G, Paris F, et al. Krüppel-like factor 4: A new potential biomarker of lung cancer. *Mol Clin Oncol.* 2016 Jul;5(1):35–40.

251. Rivero M, Montagnani V, Stecca B. KLF4 is regulated by RAS/RAF/MEK/ERK signaling through E2F1 and promotes melanoma cell growth. *Oncogene*. 2017 Jun 9;36(23):3322–33.
252. Qi X tian, Li Y ling, Zhang Y qi, Xu T, Lu B, Fang L, et al. KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019 Apr 21;40(4):546–55.
253. Valencia-Hipólito A, Hernández-Atenógenes M, Vega GG, Maldonado-Valenzuela A, Ramon G, Mayani H, et al. Expression of KLF4 is a predictive marker for survival in pediatric Burkitt lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2014 Aug 6;55(8):1806–14.
254. Yamanaka S. Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun;1(1):39–49.
255. Lindeman LC, Winata CL, Aanes H, Mathavan S, Alestrom P, Collas P. Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol*. 2010;54(5):803–13.
256. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*. 2009 May 15;137(4):647–58.
257. Lv H, Zhang Z, Wang Y, Li C, Gong W, Wang X. MicroRNA-92a Promotes Colorectal Cancer Cell Growth and Migration by Inhibiting KLF4. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2016 May 2;23(6):283–90.
258. Li W, Jiang Z, Li T, Wei X, Zheng Y, Wu D, et al. Genome-wide analyses identify KLF4 as an important negative regulator in T-cell acute lymphoblastic leukemia through directly inhibiting T-cell associated genes. *Molecular Cancer*. 2015;14(1):26.
259. Li Z, Zhao J, Li Q, Yang W, Song Q, Li W, et al. KLF4 promotes hydrogen-peroxide-induced apoptosis of chronic myeloid leukemia cells involving the bcl-2/bax pathway. *Cell Stress and Chaperones*. 2010 Nov 19;15(6):905–12.
260. Morris VA, Cummings CL, Korb B, Boaglio S, Oehler VG. Deregulated KLF4 Expression in Myeloid Leukemias Alters Cell Proliferation and Differentiation through MicroRNA and Gene Targets. *Mol Cell Biol*. 2016;36(4):559–73.

261. Kiyose H, Morita K, Maeda S, Suzuki K, Adachi S, Kamikubo Y. Deciphering the Function of KLF4 as a Differentiation Inducer in Hematologic Malignancies. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):1546–1546.
262. Lewis AH, Bridges CS, Punia VS, Cooper AFJ, Puppi M, Lacorazza HD. Krüppel-like factor 4 promotes survival and expansion in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2021 Feb 16;12(4):255–67.
263. Li S, Wu D, Jia H, Zhang Z. Long non-coding RNA LRRC75A-AS1 facilitates triple negative breast cancer cell proliferation and invasion via functioning as a ceRNA to modulate BAALC. *Cell Death & Disease*. 2020 Aug 18;11(8):643.
264. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLF4>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
265. Fregoso Lomas M, De Vito S, Boisclair Lachance JF, Houde J, Nilson LA. Determination of EGFR Signaling Output by Opposing Gradients of BMP and JAK/STAT Activity. *Current Biology*. 2016 Oct;26(19):2572–82.
266. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the <scp>EGFR</scp> in cancer. *Molecular Oncology*. 2018 Jan 27;12(1):3–20.
267. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*. 1962;237:1555–62.
268. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1986/cohen/lecture/>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
269. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
270. Roskoski R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacological Research*. 2019 Jan;139:395–411.
271. Ward CW, Garrett TP. The relationship between the L1 and L2 domains of the insulin and epidermal growth factor receptors and leucine-rich repeat modules. *BMC Bioinformatics*. 2001;2(1):4.
272. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB Receptors: From Oncogene Discovery to Basic Science to Mechanism-Based Cancer Therapeutics. *Cancer Cell*. 2014 Mar;25(3):282–303.
273. Wu D, Liu Z, Li J, Zhang Q, Zhong P, Teng T, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the growth and increases the apoptosis of human thyroid carcinoma cells

- through suppression of EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Cell International*. 2019 Dec 28;19(1):43.
274. Aoki M, Fujishita T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. In 2017. p. 153–89.
 275. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2016 Feb;109:314–41.
 276. Broggini M. RAS/RAF/MEK Inhibitors in Oncology. *Current Medicinal Chemistry*. 2012 Mar 1;19(8):1164–76.
 277. Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, Simpson PT, Steele D, Savage K, et al. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Research*. 2005 Dec 25;7(6):R1028.
 278. Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Laboratory Investigation*. 2014 Feb 30;94(2):129–37.
 279. Bera A, Zhao S, Cao L, Chiao PJ, Freeman JW. Oncogenic K-Ras and Loss of Smad4 Mediate Invasion by Activating an EGFR/NF- κ B Axis That Induces Expression of MMP9 and uPA in Human Pancreas Progenitor Cells. *PLoS ONE*. 2013 Dec 5;8(12):e82282.
 280. Kimura T, Maesawa C, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in gastrointestinal tract tumor cell lines. *Oncol Rep*. 2006 May;15(5):1205–10.
 281. Wei L, Yi Z, Guo K, Long X. Long noncoding RNA BCAR4 promotes glioma cell proliferation via EGFR/PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2019 Dec 7;234(12):23608–17.
 282. Nagalakshmi K, Jamil K, Pingali U, Reddy MV, Attili SS v. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations as biomarker for head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Biomarkers*. 2014 May 1;19(3):198–206.
 283. Li L, Dutra A, Pak E, Labrie JE, Gerstein RM, Pandolfi PP, et al. EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors. *Neuro-Oncology*. 2009 Feb 1;11(1):9–21.
 284. Nath S, Bhattacharyya J, Sarma PP, Saxena R, Sazawal S, Barman MP, et al. The Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) in Patients with

- Acute Myeloid Leukaemia. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2020 Oct 9;36(4):749–53.
285. Rao SAM, Arimappamagan A, Pandey P, Santosh V, Hegde AS, Chandramouli BA, et al. miR-219-5p Inhibits Receptor Tyrosine Kinase Pathway by Targeting EGFR in Glioblastoma. *PLoS ONE*. 2013 May 17;8(5):e63164.
 286. Xu B, Mei J, Ji W, Huo Z, Bian Z, Jiao J, et al. MicroRNAs involved in the EGFR pathway in glioblastoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021 Feb;134:111115.
 287. Augenlicht A, Saiselet M, Decaussin-Petrucci M, Andry G, Dumont JE, Maenhaut C. MiR-7-5p inhibits thyroid cell proliferation by targeting the EGFR/MAPK and IRS2/PI3K signaling pathways. *Oncotarget*. 2021 Aug 3;12(16):1587–99.
 288. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EGFR>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
 289. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research*. 2007 Jun;313(10):2050–62.
 290. Belichenko I, Morishima N, Separovic D. Caspase-Resistant Vimentin Suppresses Apoptosis after Photodynamic Treatment with a Silicon Phthalocyanine in Jurkat Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001 Jun;390(1):57–63.
 291. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7431>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
 292. Jacob JT, Coulombe PA, Kwan R, Omary MB. Types I and II Keratin Intermediate Filaments. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2018 Apr 2;10(4):a018275.
 293. Hol EM, Capetanaki Y. Type III Intermediate Filaments Desmin, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Vimentin, and Peripherin. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2017 Dec 1;9(12):a021642.
 294. Frescas D, Roux CM, Aygun-Sunar S, Gleiberman AS, Krasnov P, Kurnasov O v., et al. Senescent cells expose and secrete an oxidized form of membrane-bound vimentin as revealed by a natural polyreactive antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017 Feb 28;114(9).
 295. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindström M, Ivaska J, Ny T, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in

- wound healing via TGF- β –Slug signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Jul 26;113(30).
296. Danielsson F, Peterson M, Caldeira Araújo H, Lautenschläger F, Gad A. Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*. 2018 Sep 21;7(10):147.
 297. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011 Sep 3;68(18):3033–46.
 298. Wu S, Du Y, Beckford J, Alachkar H. Upregulation of the EMT marker vimentin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*. 2018 Dec 20;16(1):170.
 299. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=VIM>, Erişim tarihi: 07.06.2022.
 300. Golestani Eimani B, Sanati MH, Houshmand M, Ataei M, Akbarian F, Shakhssalim N. Expression and prognostic significance of bcl-2 and bax in the progression and clinical outcome of transitional bladder cell carcinoma. *Cell J*. 2014;15(4):356–63.
 301. Zhao H, Pan H, Wang H, Chai P, Ge S, Jia R, et al. SKP2 targeted inhibition suppresses human uveal melanoma progression by blocking ubiquitylation of p27. *Onco Targets Ther*. 2019;12:4297–308.
 302. Zhang C, Xie F, Li L, Zhang C, Zhang Y, Ying W, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) regulates transcription of O-GlcNAc transferase in a negative feedback mechanism. *FEBS Lett*. 2019;593(10):1050–60.
 303. Suer I, Karatas O, Yuceturk B, Yilmaz M, Guven G, Oz B, et al. Characterization of Stem-Like Cells Directly Isolated from Freshly Resected Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2014 Apr 31;9(4):347–53.
 304. Zhang B, Tian Y, Jiang P, Jiang Y, Li C, Liu T, et al. MicroRNA-122a Regulates Zonulin by Targeting EGFR in Intestinal Epithelial Dysfunction. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;42(2):848–58.
 305. Wang X, Yang J, Qian J, Liu Z, Chen H, Cui Z. S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2015;5(4):1484–95.
 306. Greaves M. Leukaemia firsts in cancer research and treatment. *Nature Reviews Cancer*. 2016 Mar 25;16(3):163–72.

307. v. P. Burke, J. M. Startzell. Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America. In: al Haitham Al Shetawi, editor. Management of Melanoma of the Head and Neck. ELSEVIER; 2008. p. 597–608.
308. Mikami Y, Philips RL, Sciumè G, Petermann F, Meylan F, Nagashima H, et al. MicroRNA-221 and -222 modulate intestinal inflammatory Th17 cell response as negative feedback regulators downstream of interleukin-23. *Immunity*. 2021 Mar;54(3):514-525.e6.
309. Hua K, Jin J, Zhang H, Zhao B, Wu C, Xu H, et al. MicroRNA-7 inhibits proliferation, migration and invasion of thyroid papillary cancer cells via targeting CKS2. *International Journal of Oncology*. 2016 Oct;49(4):1531–40.
310. Cao Q, Mao ZD, Shi YJ, Chen Y, Sun Y, Zhang Q, et al. MicroRNA-7 inhibits cell proliferation, migration and invasion in human non-small cell lung cancer cells by targeting FAK through ERK/MAPK signaling pathway. *Oncotarget*. 2016 Nov 22;7(47):77468–81.
311. Babae N, Bourajjaj M, Liu Y, van Beijnum JR, Cerisoli F, Scaria P v, et al. Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma. *Oncotarget*. 2014 Aug 30;5(16):6687–700.
312. Giles KM, Brown RAM, Ganda C, Podgorny MJ, Candy PA, Wintle LC, et al. microRNA-7-5p inhibits melanoma cell proliferation and metastasis by suppressing RelA/NF- κ B. *Oncotarget*. 2016 May 31;7(22):31663–80.
313. Li Q, Wu X, Guo L, Shi J, Li J. MicroRNA-7-5p induces cell growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis by targeting PAK2 in non-small cell lung cancer. *FEBS Open Bio*. 2019 Nov 24;9(11):1983–93.
314. Tang Y, Tang Z, Yang J, Liu T, Tang Y. MicroRNA-7-5p Inhibits Migration, Invasion and Metastasis of Intrahepatic Cholangiocarcinoma by Inhibiting MyD88. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2021 May 10;000(000):000–000.
315. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, et al. Apoptosis Initiated When BH3 Ligands Engage Multiple Bcl-2 Homologs, Not Bax or Bak. *Science* (1979). 2007 Feb 9;315(5813):856–9.
316. Swiercz A, Chechlinska M, Kupryjanczyk J, Dansonka-Mieszkowska A, Rembiszewska A, Goryca K, et al. miR-7 expression in serous ovarian carcinomas. *Anticancer Res*. 2015 Apr;35(4):2423–9.

317. Hong T, Ding J, Li W. miR-7 Reverses Breast Cancer Resistance To Chemotherapy By Targeting MRP1 And BCL2. *Onco Targets Ther.* 2019;12:11097–105.
318. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 1995 Jul;19(3):183–232.
319. Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, et al. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res.* 23(5A):3639–50.
320. Webster RJ, Giles KM, Price KJ, Zhang PM, Mattick JS, Leedman PJ. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Human Cancer Cells by MicroRNA-7. *Journal of Biological Chemistry.* 2009 Feb;284(9):5731–41.
321. Cui X, Song K, Lu X, Feng W, Di W. Liposomal Delivery of MicroRNA-7 Targeting EGFR to Inhibit the Growth, Invasion, and Migration of Ovarian Cancer. *ACS Omega.* 2021 May 4;6(17):11669–78.
322. Suto T, Yokobori T, Yajima R, Morita H, Fujii T, Yamaguchi S, et al. MicroRNA-7 expression in colorectal cancer is associated with poor prognosis and regulates cetuximab sensitivity via *EGFR* regulation. *Carcinogenesis.* 2015 Mar;36(3):338–45.
323. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood.* 1993 Jun 1;81(11):3091–6.
324. Karakas T, Maurer U, Weidmann E, Miething CC, Hoelzer D, Bergmann L. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Annals of Oncology.* 1998 Feb;9(2):159–65.
325. Sun JZ, Lu Y, Xu Y, Liu F, Li FQ, Wang QL, et al. Epidermal growth factor receptor expression in acute myelogenous leukaemia is associated with clinical prognosis. *Hematol Oncol.* 2012 Jun;30(2):89–97.
326. Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001 Apr 24;98(9):5043–8.

327. Wang Z, Gao D, Fukushima H, Inuzuka H, Liu P, Wan L, et al. Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1825(1):11–7.
328. Radke S, Pirkmaier A, Germain D. Differential expression of the F-box proteins Skp2 and Skp2B in breast cancer. *Oncogene*. 2005 May 12;24(21):3448–58.
329. Bochis O v., Irimie A, Pichler M, Berindan- Neagoe I. The Role of Skp2 and its Substrate CDKN1B (p27) in Colorectal Cancer. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2015 Jun 1;24(2):225–34.
330. Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T, Inazawa J. Amplification and Overexpression of SKP2 Are Associated with Metastasis of Non-Small-Cell Lung Cancers to Lymph Nodes. *The American Journal of Pathology*. 2004 Jul;165(1):175–80.
331. Feng S, Wang Y, Zhang R, Yang G, Liang Z, Wang Z, et al. Curcumin exerts its antitumor activity through regulation of miR-7/Skp2/p21 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Onco Targets Ther*. 2017;10:2377–88.
332. Sanchez N, Gallagher M, Lao N, Gallagher C, Clarke C, Doolan P, et al. MiR-7 Triggers Cell Cycle Arrest at the G1/S Transition by Targeting Multiple Genes Including Skp2 and Psme3. *PLoS ONE*. 2013 Jun 6;8(6):e65671.
333. Wang H, Dong Z, Yan L, Yang S, Xu H, Chen S, et al. The N-terminal polypeptide derived from vMIP-II exerts its antitumor activity in human breast cancer through CXCR4/miR-7-5p/Skp2 pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2020 Dec 5;235(12):9474–86.
334. Hu C, Zhu S, Wang J, Lin Y, Ma L, Zhu L, et al. *Schistosoma japonicum* MiRNA-7-5p Inhibits the Growth and Migration of Hepatoma Cells via Cross-Species Regulation of S-Phase Kinase-Associated Protein 2. *Frontiers in Oncology*. 2019 Mar 22;9.
335. Zhou F, Yang X, Zhao H, Liu Y, Feng Y, An R, et al. Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer. *Theranostics*. 2018;8(19):5200–12.
336. Murakami K, Kurotaki D, Kawase W, Soma S, Fukuchi Y, Kunimoto H, et al. OGT Regulates Hematopoietic Stem Cell Maintenance via PINK1-Dependent Mitophagy. *Cell Reports*. 2021 Jan;34(1):108579.

337. Ning D, Chen J, Du P, Liu Q, Cheng Q, Li X, et al. The crosstalk network of XIST/miR-424-5p/OGT mediates RAF1 glycosylation and participates in the progression of liver cancer. *Liver Int.* 2021;41(8):1933–44.
338. Harosh-Davidovich S ben, Khalaila I. O-GlcNAcylation affects β -catenin and E-cadherin expression, cell motility and tumorigenicity of colorectal cancer. *Exp Cell Res.* 2018;364(1):42–9.
339. He N, Ma D, Tan Y, Liu M. Upregulation of O-GlcNAc transferase is involved in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2021 Nov 24;
340. Kanai M, Wei D, Li Q, Jia Z, Ajani J, Le X, et al. Loss of Krüppel-Like Factor 4 Expression Contributes to Sp1 Overexpression and Human Gastric Cancer Development and Progression. *Clinical Cancer Research.* 2006 Nov 1;12(21):6395–402.
341. Wei D, Kanai M, Jia Z, Le X, Xie K. Krüppel-like Factor 4 Induces *p27^{Kip1}* Expression in and Suppresses the Growth and Metastasis of Human Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Research.* 2008 Jun 15;68(12):4631–9.
342. Wang W, Fu S, Lin X, Zheng J, Pu J, Gu Y, et al. miR-92b-3p Functions As A Key Gene In Esophageal Squamous Cell Cancer As Determined By Co-Expression Analysis. *OncoTargets and Therapy.* 2019 Oct;Volume 12:8339–53.
343. Ma Y, Wu L, Liu X, Xu Y, Shi W, Liang Y, et al. KLF4 inhibits colorectal cancer cell proliferation dependent on NDRG2 signaling. *Oncology Reports.* 2017 Feb;38(2):975–84.
344. Wei D, Kanai M, Huang S, Xie K. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis.* 2005 Jan 1;27(1):23–31.
345. Pandya AY, Talley LI, Frost AR, Fitzgerald TJ, Trivedi V, Chakravarthy M, et al. Nuclear Localization of KLF4 Is Associated with an Aggressive Phenotype in Early-Stage Breast Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2004 Apr 15;10(8):2709–19.
346. Chen YJ, Wu CY, Chang CC, Ma CJ, Li MC, Chen CM. Nuclear Krüppel-like factor 4 expression is associated with human skin squamous cell carcinoma progression and metastasis. *Cancer Biology & Therapy.* 2008 May 27;7(5):777–82.

347. Noura M, Morita K, Kiyose H, Matsuo H, Nishinaka-Arai Y, Kurokawa M, et al. Pivotal role of DPYSL2A in KLF4-mediated monocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):20245.



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİR-7-5P" İLE "AKUT MYELOİD LÖSEMİ" ("AML") İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%5

BENZERLİK ENDEKSİ

%4

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%1

2

tr.bizaareavecafe.com

İnternet Kaynağı

%1

3

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

<%1

4

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

<%1

5

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<%1

6

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<%1

7

Submitted to Okan Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

8

Submitted to Middlesex University

Öğrenci Ödevi

<%1

